By glove@smth.org

生物物理化学

程传煊

目　录

第一章　能量代谢与热力学

生物体最基本的特征之一是物质代谢，伴随着物质代谢所发生的一系列能量转变即能量代谢，是生物体基本特征的另一方面。生物系统不断地从周围环境中摄取物质，经一系列生化（合成）反应，转变成自己所需的组分，又将原有的组分通过一系列生化（分解）反应变为废料，排泄出来，并伴有能量变化和传递。

在复杂的新陈代谢中有化学（如合成、水解、异构等）过程，也有物理（如输送、排泄、能量转换等）过程。有的可认为近似于平衡或可逆过程（如细胞膜内外输送、异构和某些酶促反应等），但大多数属于不可逆过程。合成代谢一般是吸能反应，分解代谢通常是放能反应，它们复杂地组合在生命活动中，成为一不可逆的敞开系统。各种生物都具有各自遗传的特异新陈代谢过程。环境和条件也有一定的影响，使生物个体呈现出生长、发育和衰老等不同发展阶段。一切生物活动都需要能量支持。

1.1　能量转化与热力学第一定律

热力学是研究大量分子之宏观系统中的能量关系，在生物体上则研究能量转化和传递，甚至判断一个生物代谢过程能否发生。热力学是根据统计规律而得出严密和有力的解释，但对于只含少量几种某些分子细胞，应用热力学来描述时要特别谨慎。然而，热力学第一定律所言"能量转化是守恒的，能量不能创造也不能消灭。"是适合于所有系统，是真理。藉化学能如氧化作用消耗糖类、脂肪和蛋白质等转换成热和功，以维持体温与血液循环等的生物体来说，热力学是与之生死相关的问题，它在控制一切生命中起着不可磨灭的重要作用。

1.1.1 热力学能(旧称内能)、功和热

(1) 热力学能

热力学能(U)是系统内部的能量,可能包括分子的平均动能、振动能与转动能,与化学键合作用有关的能量(其中物质内的电子能量是主要的贡献),以及有关分子间非键合的相互作用能。在化学过程中,不考虑原子核内的维持能。热力学能是系统状态的单值函数(称状态函数)之一,代表物质的一个热力学状态广度性质。系统状态确定时,热力学能就具有某个固定值,与物质如何形成和怎样的途径达到这一定状态无关,但与物质的量(加和性)有关。通常我们需要的是物质从始态到终态间的能量变化值。

根据热力学第一定律能量守恒的一种表达式,当生物的某个代谢过程由始态到终态变化时,热力学能改变值可能以功和热的形式表现出来,即

$$\Delta U = q + w + \overline{U}_1 n_1 + \overline{U}_2 n_2 + \cdots + \overline{U}_i n_i = q + w + \sum_i \overline{U}_i n_i \quad (1.1\text{-}1)$$

对此敞开系统内的微小变化过程,可写成

$$dU = \delta q + \delta w + \overline{U}_1 dn_1 + \overline{U}_2 dn_2 + \cdots + \overline{U}_i dn_i = \delta q + \delta w + \sum_i \overline{U}_i dn_i \quad (1.1\text{-}2)$$

式中 U ——代表热力学能;

q ——代表热量;

w ——代表功;

n ——代表物质的量,摩尔。

(2) 热

热量 q 是系统与环境间由于温差而使能量传递的一种形式,按习惯,系统吸收热量为正值,放出热量为负值。它不是热力学的状态函数,只是在状态变化的过程中才有可能发生放热或吸热,传递热量的大小与经历怎样的途径有关。所以传递微小的热量用 δq 表示,以区别具有状态函数性质的热力学能微分变化 dU,因为只要系统的始

终态一定，热力学能的差值也就一定而与途径无关。生物体为了保持体温需要吸热(随物质流进该系统而带入或红外线吸收等)，也需要排热(伴随吐出废气和泄出废料或随蒸发水蒸气带出，甚至传出热量等)。

(3) 功

功(w)是系统与环境间除传递热量之外的另一种能量交换形式，它也不是热力学状态函数。在系统状态变化过程中是否作功，作功的大小与途径有关。所以某系统微小变化所作的功以 δw 表示。系统对环境作功为负值，反之为正值。功可能包括下列内容：对抗外压变化容积作体积(膨胀或压缩)功 PdV；表面张力所作的表面功；在电动势驱动下电子转移所作的电功等。表面功和电功通称“有效功”，以 w′表示。在生物体内表现出作功的明显例子有动物的活动、心搏动与肺呼吸等；还有植物营养液由毛细效应输送的表面功等。

$\sum_i \overline{U}_i n_i$ 或 $\sum_i \overline{U}_i dn_i$ 分别是各种物质(1、2、…、i)在敞开系统中或出入此系统的量(摩尔)所引起该系统热力学能或热力学能增减的总和。如果系统内各种物质的分子间没有相互作用和分子体积相同的理想状况下，$\overline{U}_i$ 可代表单独存在的 i 物质分子摩尔热力学能 $\widetilde{U}_i$。由于分子间相互作用和体积不同的影响，混合系统中各种物质分子的热力学能与它们单独存在时的有差异，所以要用偏微分符号 $\overline{U}$ 以区别分子的摩尔热力学能 $\widetilde{U}$。当系统处于非加和性的状态强度性质之温度和压力(P)一定时，$\overline{U}_i$ 即为系统热力学能对 i 物质分子的偏微摩尔量 $\left(\frac{\partial U}{\partial n_i}\right)_{T,P,n_j}$，通称 i 分子的偏摩尔热力学能。括号外注脚 n_j 为除了 i 物质分子数微小变化之外，其它各种物质分子数都不变的标志。

偏摩尔热力学能的物理意义：等温等压下，在大量系统中除了 i 组分之外，保持其它组分的数量不变，加入一摩尔 i 时所引起的系统广度性质热力学能的改变，或是在有限量的系统中加入微(少)量 dn_i

摩尔 i 后,系统热力学能的变化值(详见第二章)。

一个与环境间没有物质流的封闭系统中只做反抗外压的体积功(PdV)时,热力学第一定律表达式可改为

$$dU = \delta q - PdV \quad (1.1\text{-}3)$$

若实验系统与环境间造成不能热传导的绝热条件,则 $\delta q = 0$,系统做体积膨胀功会引起热力学能的减少。

如果该封闭系统在恒容条件下发生状态变化,则

$$dU = \delta q_v \text{ 或 } \Delta U = q_v \quad (1.1\text{-}4)$$

在上述恒容条件下封闭系统状态变化的热力学能变化值,可以应用恒容量热法测定恒容热 q_v 而直接算出。换言之,ΔU 是恒容过程封闭系统所吸收(或放出)热量的度量。

1.1.2 焓和生成焓

(1) 焓

确定了热力学状态(定态)的系统必处于平衡态,其所有的状态函数(如强度性质的温度、压力,广度性质的热力学能、物质的量(摩尔)等等)均只有一单值,也就是说,所有状态变数有定值时,系统必处于平衡态(或定态)。不过所有状态变数并非都是独立的,只要确定系统中所有独立的化学物质之质量和品种,再确定二个状态变数(例如温度、压力和体积中任选二个为定值),那么系统的状态就被确定了,系统的所有性质也即有了定值。于是人们可将热力学能加压力与体积的乘积定义为另一状态函数(焓),即

$$H = U + PV \quad (1.1\text{-}5)$$

或

$$\Delta H = \Delta U + \Delta(PV) \quad (1.1\text{-}6)$$

式中 H——代表焓。

焓也是系统的一个与物质数量有关的广度状质之状态单值函数,定态时有确定值,不依赖于途径。焓变 ΔH 在生物系统的热化学领域中比热力学能变化更有用,因为绝大多数天然生物化学代谢过程通常发生于几乎压力不变的条件下,而发生在体积不变的过程却是比较少的。

对于一个在恒压下仅做体积功的封闭系统，热力学第一定律的(1.1-3)式可变为

$$dU = \delta q_P - d(PV) \tag{1.1-7}$$

于是

$$\Delta H = q_P \tag{1.1-8}$$

在上述条件下，随着系统由始态到终态的状态变化，系统的焓变等于恒压下过程所放出(或吸收)的热，以 q 右下脚注 P 代表恒压下传递的热量，它原则上可应用量热计来测定并计算。这比在处理生物化学过程中用热力学能来计算能量转换要方便得多，因为使用热力学能变化计算时还需知道(PV)乘积的改变值。

当系统的焓发生微小变化而不做"有效功"w'时，则以系统热力学能、压力和容积组合的(1.1-5)式可以写成

$$\begin{aligned} dH &= d(U + PV) = dU + PdV + VdP = \delta q + \delta w + PdV + VdP \\ &= \delta q + \delta w' - PdV + PdV + VdP = \delta q + VdP \end{aligned} \tag{1.1-9}$$

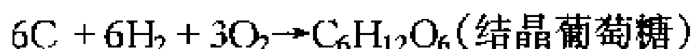
对于压力不变所进行的态变过程，从上述公式也可得到(1.1-8)式。此式表达了 ΔH 是封闭系统恒压过程所吸收(或放出)热量的度量，如过程是放热的，则 ΔH 为负值，反之，ΔH 为正值。

绝大多数生物化学过程是在液体或固体中进行的，其系统的体积变化远不如在气体中进行的那样明显，所以通常可忽略其微小的体积变化，于是在生物化学中，人们往往不考虑 ΔH 和 ΔU 的差别。

(2) 生成焓

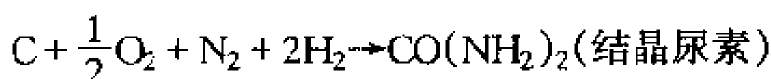
生物系统的物质代谢过程一般都在等温等压下进行，其化学反应所产生的热效应等于生成物焓的总和与反应物焓的总和之差($q_P = \Delta H$)。实际上参与化学反应的各个物质焓(H_i)之绝对值是无法测得的，所以人们皆采用相对的标准来计算 ΔH。现规定在 100kPa(旧的为 1 大气压)、化学反应参考温度 298.2K 时，由最稳定的单质合成标准态〔100kPa(旧的为 1 大气压)和参考温度 298.2K〕下 1 摩尔化合物的反应焓变为该化合物的标准生成焓，并以 $\Delta H_f^\ominus$ 表示〔右上角的$\ominus$是 100kPa(旧的为 1 大气压)标准态的标志，右下角 f 为生成热符号〕。通常，298.2K 参考温度的各物质标准生成焓可查手册数

据表。例如



$$6C + 6H_2 + 3O_2 \rightarrow C_6H_{12}O_6 \text{(结晶葡萄糖)}$$

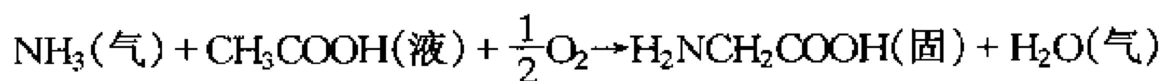
$$\Delta H^{\ominus}_{f,298.2K} = -1260.3 \text{ 千焦/摩尔}$$



$$C + \frac{1}{2}O_2 + N_2 + 2H_2 \rightarrow CO(NH_2)_2 \text{(结晶尿素)}$$

$$\Delta H^{\ominus}_{f,298.2K} = -333.19 \text{ 千焦/摩尔}$$

一个化合物的标准生成焓并非该化合物焓的绝对值，而是相对于合成它的单质之相对焓（即焓变值）。按上述标准生成焓定义规定，在100kPa（旧的为1大气压）以及298.2K时，最稳定单质的标准生成焓都等于零〔例如O_2（气）、C（石墨碳）等〕。虽然生物系统中很多不是或者不能直接由单质合成，而是在生物代谢过程中经复杂的生化反应途径产生的，但它可根据盖斯定律来计算。这是由于等温等压下系统中化学反应的热效应仅与始态和终态有关，而与变化的途径无关（因为$q_p = \Delta H$），也就是说，只要化学反应的始态和终态是定态，状态函数的ΔH便为定值，对于化合物通过怎样的具体中间途径来完成完全无关。因此即可利用标准生成焓来计算各种反应的焓变$\Delta H^{\ominus}_{298.2K}$（或热效应）。例如：



$$NH_3\text{(气)} + CH_3COOH\text{(液)} + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2NCH_2COOH\text{(固)} + H_2O\text{(气)}$$

$$\begin{aligned}\Delta H^{\ominus}_{298.2K} &= \Delta H^{\ominus}_{f\,H_2O(\text{气})} + \Delta H^{\ominus}_{f\,\text{甘氨酸(固)}} - \Delta H^{\ominus}_{f\,NH_3(\text{气})} \\ &\quad - \Delta H^{\ominus}_{f\,CH_3COOH(\text{液})} - \frac{1}{2}\Delta H^{\ominus}_{f\,O_2(\text{气})} \\ &= \sum(\Delta H^{\ominus}_f)_{\text{产物}} - \sum(\Delta H^{\ominus}_f)_{\text{反应物}} \qquad (1.1\text{-}10)\end{aligned}$$

查得由气态分子氮、氧、氢与碳（石墨）生成固态甘氨酸（H_2NCH_2-COOH）的标准生成焓是-524.9千焦/摩尔，H_2O（气）的标准生成焓为-241.8千焦/摩尔，液态乙酸的标准生成焓是-487.0千焦/摩尔，气态NH_3的标准生成焓为-46.2千焦/摩尔；标准态O_2（气）的生成焓为零(参见表1-1)，则上述反应的焓变等于$(-524.9)+(-241.8)-[(-487.0)+(-46.2)]=-233.5$千焦/摩尔。然

表 1-1　一些单质和化合物在 100kPa、298.2K 时的热力学数据

物　质	$\Delta H^{\ominus}_{298.2}$ 千焦/摩尔	$\Delta G^{\ominus}_{298.2}$ 千焦/摩尔	$S^{\ominus}_{298.2}$ 焦/开·摩尔	$C^{\ominus}_{p298.2}$ 焦/开·摩尔
C(c,金刚石)	1.90	2.87	2.44	6.07
C(c,石墨)	0	0	5.69	8.66
C(g,　)	718.38	672.97	157.99	20.84
H_2(g)	0	0	130.59	28.83
H(g)	217.94	203.24	114.61	20.79
D_2(g)	0	0	114.77	29.20
D(g)	221.68	206.51	123.24	20.79
HD(g)	0.15	−1.64	143.68	29.20
O_2(g)	0	0	205.03	29.36
O(g)	247.52	230.09	160.95	21.91
O_3(g)	142.2	163.43	237.6	38.16
S(c,斜方)	0	0	31.88	22.59
N_2(g)	0	0	191.49	29.12
N(g)	472.64	455.51	153.19	20.79
P(c,白)	0	0	44.0	23.22
CO(g)	−110.52	−137.27	197.91	29.14
CO_2(g)	−393.51	−394.38	213.64	37.13
H_2O(g)	−241.83	−228.59	188.72	33.58
H_2O(l)	−285.84	−237.10	69.94	75.30
NO_2(g)	33.85	51.84	240.45	37.91
SO_2(g)	−296.06	−300.37	348.52	39.79
H_2S(g)	−20.15	−33.02	205.64	33.97
NH_3(g)	−46.19	−16.63	192.51	35.66
C_6H_{12}环己烷(g)	−123.14	31.76	298.24	106.27
(l)	−156.23	24.73	204.35	156.48
$NaC_2H_3O_2$ 醋酸钠(c)	−710.44	(−608.35)	123.01	80.33
CH_3COOH 醋酸(l)	−487.02	−381.58	293.30	123.43
$NaHCO_3$(c)	−947.68	−851.86	102.09	87.61
HCOOH 甲酸(l)	−409.2	−346.02	128.95	99.04

续表

物　质	$\Delta H^{\ominus}_{298.2}$ 千焦/摩尔	$\Delta G^{\ominus}_{298.2}$ 千焦/摩尔	$S^{\ominus}_{298.2}$ 焦/开·摩尔	$C^{\ominus}_{p298.2}$ 焦/开·摩尔
CH_2O 甲醛(g)	-115.9	-110.04	220.08	35.35
C_2H_5OH 乙醇(l)	-277.63	-174.77	160.70	111.46
$CH_2OHCHOHCH_2OH$ 甘油(l)	-659.40	-469.03	207.94	223.01
$C_{12}H_{22}O_{11}$ 蔗糖(c)	-2220.87	-1529.67	359.82	430.95
$CO(NH_2)_2$ 尿素(c)	-333.19	-197.15	104.60	93.14
$CH_2(NH_2)COOH$ 甘氨酸(l)	-528.56	-370.74	109.20	99.16
左旋亮氨酸	-637.64	-347.69		
左旋色氨酸	-415.05	-119.24		
甘氨酰甘氨酸	-745.17	-487.85		
左右旋亮氨酰甘氨酸	-860.23	-470.28		
甘氨酰-左右旋色氨酸	-622.58	-228.86		

$\Delta H^{\ominus}_{298.2}$——在标准态下，由单质形成化合物的生成焓；

$\Delta G^{\ominus}_{298.2}$——在标准态下，由单质形成化合物的生成自由能；

$S^{\ominus}_{298.2}$ ——标准态下规定熵；

$C^{\ominus}_{p298.2}$——100 kPa、298.2K 时恒压热容；(温度变化不大时可当作常数)

(g)、(l)、(s)、(c) 分别表示气态、液态、固态和结晶态。

而从不同数据表上所查得的各物质标准生成焓值往往有些差异。

对于参与反应式中的各物质来说，它们的标准态都规定在 100 kPa(旧的为 1 大气压)下和 298.2K 时假定理想的存在状态。气体的存在状态是指服从理想气体定律及其状态方程 PV＝nRT 的纯气体；液体的通常是指纯液体；固体的系指纯固体；对于溶液中的溶质则是 1 摩尔/升浓度时之活度系数仍为 1 的假想状态。

有机化合物的生成焓，可以应用量热计测定该化合物完全燃烧时所放出的热量来算得。手册中载有各种有机化合物的燃烧热 $\Delta H^{\ominus}_c$ 数据(参见表 1-2)，右下角 c 为燃烧热符号，它指 1 摩尔有机物完全燃烧所放出的热，但已化作 100kPa(旧的为 1 大气压)和 298.2K

时完全燃烧的焓变(因为$\Delta H_c^{\ominus}=q_p$)。燃烧产物一般指定该有机物中的C变为CO_2(气);H变为H_2O(液);N变为N_2(气);S变为SO_2(气)等。O_2的燃烧热指定为零。乙酸的燃烧热$\Delta H_{c\,298.2K}^{\ominus}$为$-871.7$千焦/摩尔,由此计算乙酸的标准生成焓。按规定乙酸的燃烧反应式应写成



$$CH_3COOH(液)+2O_2(气)\rightarrow 2CO_2(气)+2H_2O(液)$$

$$\Delta H_c^{\ominus}=-871.7\ 千焦/摩尔$$

按(1.1-10)式计算,即

表1-2　100 kPa、298.2K条件下有机物燃烧热

化　合　物	$\Delta H_{c\,298.2}^{\ominus}$ 千焦/摩尔	化合物	$\Delta H_{c\,298.2}^{\ominus}$ 千焦/摩尔
C_2H_5OH 乙醇(l)	-1366.9	$C_6H_{12}O_6$ 葡萄糖(c)	-2815.8
CH_3COOH 乙酸(l)	-871.5	$C_{12}H_{22}O_{11}$ 蔗糖(c)	-5648.4
$HOCH_2CH_2OH$ 乙二醇(l)	-1192.9	$CH_3COOC_2H_5$ 乙酸乙酯(l)	-2251.0
$HOH_2CCHOHCH_2OH$ 丙三醇(l)	-1664.4		
$C_{17}H_{35}COOH$ 硬脂酸(c)	-11274.6		
$C_{15}H_{31}COOH$ 软脂酸(c)	-9790.6		
$CO(NH_2)_2$ 尿素(c)	-632.0		

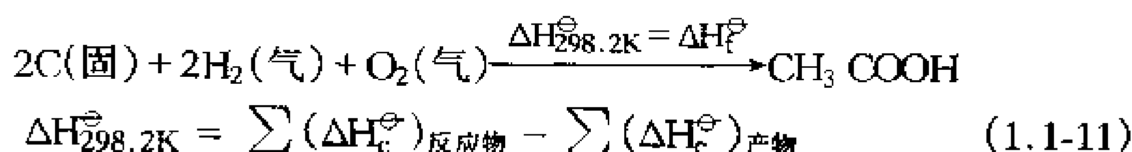
$$\Delta H_c^{\ominus}=\Delta H_{298.2K}^{\ominus}=\sum(\Delta H_f^{\ominus})_{产物}-\sum(\Delta H_f^{\ominus})_{反应物}$$

$$=-393.51\times2+(-285.84\times2)-\Delta H_{f乙酸}^{\ominus}-0$$

$$\Delta H_{f乙酸}^{\ominus}=-393.5\times2+(-285.84\times2)+871.7$$

$$=-487\ 千焦/摩尔$$

或者通过乙酸的生成热反应式,应用参与反应的物质燃烧热$\Delta H_c^{\ominus}$计算其标准生成热:



$$2C(固)+2H_2(气)+O_2(气)\xrightarrow{\Delta H_{298.2K}^{\ominus}=\Delta H_f^{\ominus}}CH_3COOH$$

$$\Delta H_{298.2K}^{\ominus}=\sum(\Delta H_c^{\ominus})_{反应物}-\sum(\Delta H_c^{\ominus})_{产物}\qquad(1.1\text{-}11)$$

同样也可得到 $\Delta H^{\ominus}_{乙酸} = -393.51\times2+(-285.84\times2)-(-871.7) = -487$ 千焦/摩尔

理论上,从键焓也可估计生成焓。一切化学反应实际上都是原子或原子团随着旧化学键的破裂和新键的形成而重新排列组合,因此会发生能量的变化而出现热效应。若知道分子中联系各原子的每个化学键键焓,即可根据反应始终态的化学键变化情况,算得反应焓变。有关键焓的数据见表 1-3。可惜各种有关键焓的数据很不完善,且各种键焓表上的数据差异较大,即不够准确。

表 1-3 有关键焓的数据(千焦/摩尔)

单键:				双键或叁键:	
C−C	344	N−H	391	C=C	615
C−H	415	N−N	159	C=O	724
C−O	350	N−O	175	C=N*	351.5
C−N	292	S−H	368	C=S*	~451.9
C−S*	226	S−S	266	O=O*	~401.7
H−H	436	P−O*	~306.1		
O−H	463	P−H*	263.6	C≡C	812
O−O	143			N≡N	946

摘自 Barrow:Physical Chemistry(1973)

* 摘自 H.M.Барен 等:Краткий Справочник Физикохимических Величин(1959)

Geoffrey Zubay:Biochemistry(1984)及其他。

键焓与键的分解能(或键能)在意义上有所不同。键分解能是解开化合物中某一具体键所需的能量,而键焓系指拆散某类键的一个平均值。

利用键焓数据可得气态原子合成气态化合物时的反应焓变 ΔH,要计算某化合物的生成热还需各元素单原子气态和生成物气态相对于其标准态的焓差 ΔH,即 C(固→气):715.0;H($\frac{1}{2}H_2$ 气→H 气):218.0;N($\frac{1}{2}N_2$ 气→N 气):472.7;P(白→气):333.9;O($\frac{1}{2}O_2$ 气→O 气):249.2;S(固→气):279.0 等,单位为千焦·摩$^{-1}$(摘自傅

鹰著化学热力学,1963)。

例如由键焓 ε 计算乙醇(液)的标准生成焓,首先务必分析反应前后分子的分子结构中的键类型及其数量,即乙醇分子中有一个 C-C 键、五个 C-H 键、一个 C-O 键和一个 O-H 键,然后写出反应式:

$$2C(g)+6H(g)+O(g)\xrightarrow{\Delta H^{\circ}_{298.2K}}C_2H_5OH(g)$$

$$\Delta H^{\circ}_{298.2K}=\sum_i \varepsilon_{i反应物}-\sum_i \varepsilon_{i生成物} \tag{1.1-12}$$

$$=-[\varepsilon_{C-C}+5\varepsilon_{C-H}+\varepsilon_{O-H}+\varepsilon_{C-O}]$$

$$=-[344+415\times5+463+350]=-3232\ 千焦$$

气态原子不是稳定的单质,所以还需知道稳定的单质变为气态原子时发生的焓变,即



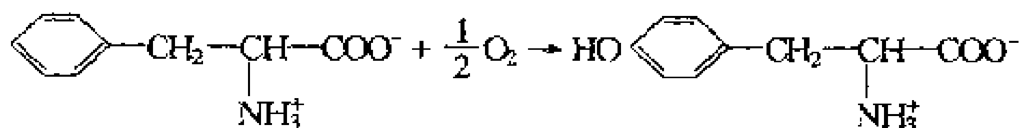
$$2C(固)+3H_2(气)+\frac{1}{2}O_2(气)\xrightarrow{\Delta H}2C(气)+6H(气)+O(气)$$

$$\Delta H=715\times2+218\times6+249.2=2987.2\ 千焦$$

C_2H_5OH 由气体变为液体需放出相变热 $\Delta H^{\circ}_{相}=-42.3$ 千焦/摩尔。于是乙醇的标准态生成焓 $\Delta H^{\circ}_{f乙醇}=2987.2+(-3232)+(-42.3)=-287.1$ 千焦/摩尔。将此计算值与数据 277.6 千焦/摩尔相比,偏差约有 3.4%。

对于以键焓方法计算乙酸(液)的标准生成焓仅得 2800.4+(-3126)+(-50.6)=-376.2 千焦/摩尔,这与其标准生成焓数据 487.0 千焦/摩尔 比较,偏差就很大了。究其原因,上述计算仅单纯从键能分析出发,忽略了分子结构中大 π 键引起的共振能、空间位阻能、分子间相互作用能或溶剂化能等影响。然而忽视这些因素有时会严重地造成估算的错误,例如乙酸的—$C{=O \atop -OH}$基团的影响使偏差高达约 23%。

若苯丙氨酸用分子氧氧化为酪氨酸的反应如下:



对比产物和反应物的分子结构,可知共振能变化较小,水化作用变化

也较小，在这种情况下应用键焓估算反应的焓变，其偏差较小。

1.2 热力学的分子统计意义

从分子观点看，系统的热力学能或焓增加，会使分子的平动能增加，必然有些是以转动和分子内振动能的形式储存，还会引起分子间相互作用能改变和少许分子中电子跃至激发态，致使能量在大量分子的系统中有一个最可几分布。瞬时间的能量分布起伏，偶然出现几乎所有能量都集中在少数分子内的这种不可几方式分布能量，它在少数分子系统中时有可能发生。不过在分子数非常多的系统中，如此极端起伏的现象相对出现的次数变得越来越少。

最可几分布是热力学能或焓不变时，封闭系统内粒子在满足总能量约束条件下，处于所有可能的量子化能态上排列方式最多的分布。现以 $N=6$ 和 $U=10\varepsilon$ 的约束条件下粒子在可能的能态上分布为例（见图 1-1）。

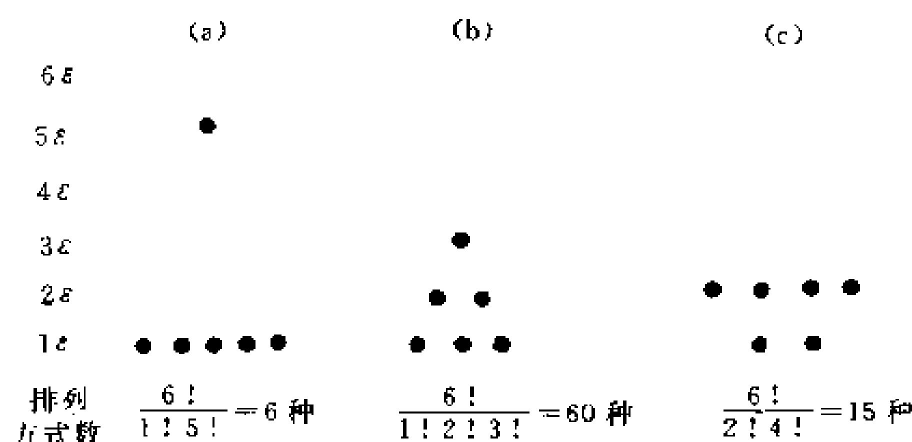


图 1-1 在 $U=10\varepsilon$ 约束条件下，6 个粒子在能态上的某些分布

将 N 个粒子排列成一组 N_1 个、另一组 N_2 个等的排列方式数以热力学几率 Ω 表示，即

$$\Omega=\frac{N!}{N_1!\ N_2!\ \cdots N_i!} \tag{1.2-1}$$

系统中的粒子数越多，其均匀排布的方式越是远远地大于不均匀排

布的。最可几分布相当于粒子在能态上排列几率最大(微观状态数最多)的分布。系统处于或接近平衡状态时就有一个一定的最可几分布,必然应有一个不同于热力学能或焓的状态单值函数来描述。

1.2.1 熵与热力学第二定律

热力学第二定律指出,自发变化乃是热力学的不可逆过程,都不会自动逆向进行。系统不可几方式分布能量的状态会自发向最可几分布变化。但这并不意味着绝对不可能倒转,借助于外力是可以使一个自发变化逆向进行的,不过这必然消耗了环境能量。因此,过程的方向性是可由系统的热力学几率 Ω 来体现,于是它具有统计意义。然后发现在自发过程中,系统的热力学几率 Ω 与克劳修斯根据热机研究所定义的热力学状态函数熵(S),同样都具有趋向于增加的变化方向,同时又均是状态函数(即 U、V、N 的函数),不过熵具有广度性而几率具有相乘性质。玻兹曼为了满足熵的加和性质,就将它们以对数函数的形式联系起来,即

$$S = k\ln\Omega \tag{1.2-2}$$

对于 1 摩尔分子,则

$$\tilde{S} = Lk\ln\Omega = R\ln\Omega \tag{1.2-3}$$

式中 k——代表玻兹曼常数,它等于 R 除以 L;

L——代表阿佛加德罗常数;

R——代表气体常数。

基于熵是系统的一种广度性质的状态函数,若由熵为 S_1 和 S_2 两部分系统组成大系统,则该大系统的熵 S 可写成

$$S = S_1 + S_2 = k\ln\Omega_1 + k\ln\Omega_2 = k\ln\Omega_1 \times \Omega_2 = k\ln\Omega \tag{1.2-4}$$

以上公式说明熵值随热力学几率 Ω 的增大而增加。自然界一切自发过程倾向于从低几率(通称有序的)状态到微观状态数最多的高几率(通称无序的)状态,于是系统状态函数熵是系统微观状态数或无序的一种量度。熵值小对应于较有序状态;熵值大对应于较无序状态。熵的增加(即 ΔS 为正值)对应于较有序向较无序的状态变化;相反的过程(即 ΔS 为负值的)只有在外力推动下方可能发生。最明

显的例子是气体仅会无序地均匀充满容器，在容器施以压缩功才可能将气体赶至一边，这也说明熵与焓反映的事物规律有很大的不同，前者往往更多地联系到分子的运动(平动、转动等)，后者常更多地涉及电子能量与分子振动能。在绝对零度，所有分子皆处于其最低的热力学能状态(焓≈热力学能)，并形成完美晶体时，$\Omega = N!/N! = 1$，则熵等于零。由于 Ω 不会小于 1，因而物质的熵不会是负值。系统定态时熵有一定的正值。故将它称为规定熵或绝对熵。部分物质的规定熵见表 1-1。

讨论自发变化具有不可逆性，即化学反应的方向性和限度问题，可以藉热力学第二定律和状态函数熵的统计意义来进行判断。在与环境无物质交换、无能量传递的隔离系统中，由较有序向较无序的状态变化是自发过程的方向，而熵不会减少，即

$$dS_{隔离} = dS_{系} + dS_{环} \geq 0$$

或 $$\Delta S_{隔离} = \Delta S_{系} + \Delta S_{环} \qquad (1.2\text{-}5)$$

(1.2-5)式含意：将和系统密切相互作用的环境与该系统包括在一起形成了一种所谓隔离系统。当此隔离系统内发生自发的不可逆变化，熵应增加(用 $\Delta S > 0$ 来判断)，到达平衡状态时熵增至某最大的定值。如果该隔离系统内所进行的过程中每一瞬间都接近于平衡状态，则整个过程即可视为是由一系列近平衡态所构成的准静态过程，也就是发生了可逆过程，于是 $\Delta S = 0$。

1.2.2 影响熵值的因素

根据熵计算公式的推导，若封闭系统与环境有无限小热量交换为一可逆变化，即可应用熵变的经典公式：

$$dS = \frac{dq_{可逆}}{T} \qquad (1.2\text{-}6)$$

式中 T——代表绝对温标(开或 K)。

可逆变化用等号，不可逆变化的系统熵值变化不等于 $\delta q_{不可逆}/T$。对于系统中有限等温过程，则

$$\Delta S = \frac{q_{可逆}}{T} \qquad (1.2\text{-}7)$$

该公式表明：若希望计算系统从态1变为态2时的熵变，只需设想两态间通过一条可逆途径，并计算所传递（吸收或放出）的热量。例如1摩尔水在沸点蒸发，可设想由水到汽是准静态过程，所测得的蒸发热（或凝聚热）为40630焦/摩尔（在1大气压(atm)条件下，此时的$q_{蒸发}=\Delta H_{气化}$）。因此，该等温过程的$\Delta S=40630/373.2=108.9$焦/开。对于在1大气压下0℃(273.2K)冰熔化，作为等温可逆过程，每摩尔之$\Delta S=\frac{q_{熔化}}{T}=\frac{\Delta H_{熔化}}{T_{熔化}}=22$焦/开。(1atm等于101.325kPa)

1摩尔理想气体从体积V_1等温可逆膨胀到容积V_2，可以导得如下的ΔS计算公式：

$$\Delta S=R\ln\frac{V_2}{V_1} \tag{1.2-8}$$

也可用物质的量浓度C表达，即

$$\Delta S=R\ln\frac{C_1}{C_2} \tag{1.2-9}$$

当两种可互溶的液体混合后，从纯液体到混合液体所发生的熵变计算公式为：

$$\Delta S=-n_aR\ln X_a-n_bR\ln X_b \tag{1.2-10}$$

式中　n_a、n_b——分别代表混合液体a及b的物质之量，摩尔；

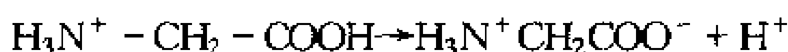
X_a、X_b——分别代表a及b相应的摩尔分数。

由于X_a和X_b总是小于1，致使$\ln X_a$和$\ln X_b$为负值，所以两互不改变分子间作用力的互溶液体混合成为理想溶液后，熵值会增加。溶质的溶剂化，氢键的产生，溶剂分子的缔合作用变化或溶质间的缔合等，都会显著地影响溶液的熵，往往使溶液中熵值减少。

溶质和溶剂分子之间的溶剂化作用，会使溶质和溶剂分子的无序运动都受到限制而导致它们的熵值减少，不过，人们通常将所有熵值的减少皆归于由溶质引起的。若溶质在水中是离子，则随离子电荷的增加和半径的减少，溶剂化熵变负得更多。阴离子比阳离子更易水化。偶极分子的强烈相互作用或氢键供体与受体的键合作用均

限制了水的无序运动，从而减少了它们的熵值。离子在水中溶剂化，焓变越负越有利于离子的溶解，但往往焓变超过熵变，表现为离子能溶解。非极性分子在水中常进入由氢键形成的相当坚固的笼内，结果熵值也减少。

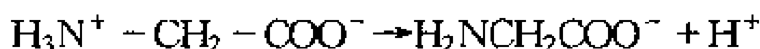
一个两性离子氨基酸在电离去质子之前已是高度水合，它的一级电离和二级电离使熵值降低得比一个典型弱酸(一般电离熵值在 −92 焦/开·摩左右)少得多。例如甘氨酸阳离子一级电离成两性离子：



$$H_3N^+-CH_2-COOH \rightarrow H_3N^+CH_2COO^- + H^+$$

$\Delta S^{\ominus} = -30.5$ 焦/开·摩

由上述两性离子二级电离成阴离子时，即



$$H_3N^+-CH_2-COO^- \rightarrow H_2NCH_2COO^- + H^+$$

$\Delta S^{\ominus} = -38.5$ 焦/开·摩

甘氨酸电离出质子，原应生成更多粒子而导致熵增加，但因水合效应使离子和质子以水合形式包缠了大量水，从而使熵值大为降低。

根据统计热力学推得，物质分子的摩尔熵是随相对分子质量增大而增加，液态碳氢化合物分子中每增加 1 个 CH_2 链节，其摩尔熵约增加 32.2 焦/开×摩，固态的约为 24.3 焦/开×摩。饱和脂肪酸在生物体内分解代谢时，在酶和辅酶 A 的帮助下，每一轮 β-氧化过程，会降低了 2 个 CH_2 链节，其减少熵值约为 64.6 焦/开，但溶液中多增加了一小分子乙酰辅酶 A，将导致熵值增加。

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸还原型(以 NADH 表示)，还原丙酮酸离子的反应中，即



$$H^+ + NADH + 丙酮酸^- \rightarrow 乳酸^- + NAD^+$$

由于 NAD^+ 离子比质子大得多，反应中会有许多水分子释放出来，因此反应导致熵增(约 69 焦/开)。

天然蛋白质分子是一种被高度组织起来的多级有序结构，一旦变性，一方面分子会发生伸展和解开而使熵增加，另一方面可能与溶剂的相互作用有某种方式的变化，以致熵变又有所增减。

通常，人体的温度维持在 310K(37℃)左右，比标准态参考温度(298K)要高，由于无序性随温度增高而增加，其熵值也有所增加，即

$$\Delta S = \int_{T_1}^{T_2} \frac{C_P}{T} dT \tag{1.2-11}$$

温度变化不大时，等压热容 C_P 可视为常数，则

$$\Delta S = C_P \ln\left(\frac{T_2}{T_1}\right) \tag{1.2-12}$$

根据以上的讨论可知，在非隔离系统的生物体内是无法应用熵增原理来判定反应的自发性与方向性。生物化学实验往往在恒压和恒温条件下进行，就需要新的状态函数来预测反应的自发性和方向性，以及确定系统达到平衡的终点。

1.3 自由能与反应自发性判据

吉布斯(Gibbs)提出一个新的状态函数称为自由能(后人常称吉布斯自由能)，其定义为

$$G = H - TS \tag{1.3-1}$$

它由广度性状态函数 H 与 S 和强度性状态函数 T($T \times S$ 是广度性质)组合的，也是广度性质。系统在定态(平衡态)时，G 必有定值。

1.3.1 自由能判据

在恒温条件下发生反应的自由能变化为

$$\Delta G = \Delta H - \Delta(TS) = \Delta H - T\Delta S \tag{1.3-2}$$

由此可见，ΔG 是 ΔH 和 ΔS 的组合，系统热力学能降低到最小和分子运动或能量分布趋向无序使熵达最大值，都会导致系统自发地向平衡态方向变化，即自由能变化 ΔG 为负值的反应是自发的过程。

根据(1.3-1)自由能定义式，系统发生一微小状态变化，则

$$dG = dH - TdS - SdT = dU + VdP + PdV - SdT - TdS \tag{1.3-3}$$

若引起自由能变化 dG 过程是可逆的，$q_{可逆} = TdS$，$dU = TdS - PdV - \delta w'$，则(1.3-3)式可简化为

$$dG = VdP - SdT - \delta w'(\text{可逆过程}) \quad (1.3\text{-}4)$$

于是，系统在恒温、恒压下进行一可逆过程时，

则 $$-dG = \delta w' \quad (\text{可逆过程}) \quad (1.3\text{-}5a)$$

此式含意：在等温等压下，封闭系统自由能减少可做出最大有效功。这即可进一步推得：若过程是不可逆的，则所做的有效功必小于系统自由能的减少值。

倘若有效功是电功，则

$$-dG = nFE \quad (1.3\text{-}5b)$$

式中 F——代表摩尔电量单位，其值等于 96485 库仑/摩尔，称法拉第常数；

E——代表电池电动势；

n——代表电子转移的量，摩尔。

对于仅做体积功的系统，$\delta w' = 0$，在等温等压条件下，可以得到一重要的结论：

$$-dG \geqslant 0 \quad \text{或} \ dG \leqslant 0 \quad (1.3\text{-}6)$$

按上述条件，无外界影响下，自发变化总是向自由能减少的方向（$dG < 0$）进行，直至减少到该情况下所允许的最小值（$dG = 0$），达到平衡态为止，自由能就不再变化。系统不可能自动发生自由能增加（$dG > 0$）的变化。

以天然蛋白质或多肽的变化为例，可以认为天然蛋白质有单一的有序构象，$\Omega_{天然} = 1$。变性后多级结构的链解开和伸展，可形成多种构象，$\Omega_{变性} \gg 1$，则 $\left(\Omega_{变性}/\Omega_{天然}\right) \gg 1$，$\Delta S_{变性} = R\ln\left(\frac{\Omega_{变性}}{\Omega_{天然}}\right) > 0$，熵值增加使(1.3-2)式等号右边第二项为负值。破坏那些维持天然构象的蛋白质内相互作用时，务必需要能量，ΔH 也将是正。因而可看到温度稍低时，$\Delta G > 0$（$T\Delta S < \Delta H$），天然态应是稳定的。当温度足够高时，$\Delta G < 0$（$T\Delta S > \Delta H$），变性态稳定，于是天然态自发向变性态转变。然而天然态$\rightleftharpoons$变性态处于系统中或多或少两者皆有的平衡状态后 $\Delta G = 0$，这就是自由能通常可作为过程自发性和方向性或处于

平衡状态的判据。

若解开的蛋白质分子链有强烈的溶剂化作用,则系统内总的焓效应是放热的,即 ΔH 为负值而 ΔG 必为负值,那么任何温度下变性都会自发进行。不过,分子从有序构象变到无序构象的总熵变中就可能会包含溶剂化束缚大量水分子而使熵减少之项。此时,低温有利于蛋白质解开。

亥姆霍兹定义一类似量: $A = U - TS$,称亥姆霍兹自由能,它是在等温等容限制条件下,以 $dA \leqslant 0$ 作为自发过程或可逆过程(平衡态)的判据,在生物化学中很难遇到这种情况,因而不太有用。

如果系统在等温下从 P_1、V_1 变化到 P_2、V_2 时只做体积功,根据(1.3-4)式可知 $\delta w' = 0$,则

$$dG = VdP \quad 或 \Delta G = \int_{P_1}^{P_2} VdP \qquad (1.3\text{-}7)$$

对于理想气体可得

$$\Delta G = nRT\ln\frac{P_2}{P_1} = nRT\ln\frac{V_1}{V_2} \qquad (1.3\text{-}8)$$

假定在 27℃ 时 1 摩尔氧气(当作理想气体),从 10 大气压等温可逆膨胀到 1 大气压,则 $-\Delta G = W_R$(可逆功)。

$$\Delta G = RT\ln\frac{P_2}{P_1} = 8.314 \times 300.2 \times \ln\frac{1}{10} = -5747.97 \text{ 焦(自发进行)}$$

$W_R = -\Delta G = 5747.97$ 焦(对外做功)

理想气体可逆过程,$\Delta H = 0$,$\Delta U = 0$,$q_R = W_R = 5747.92$ 焦(吸热过程)。$\Delta S = \frac{q_R}{T} = \frac{5747.97}{300.2} = 19.15$ 焦/开,无序程度增加。

自由能与温度的关系可以用吉布斯-亥姆霍兹公式定量地表达。从反应的 ΔG 在压力恒定的条件下随温度的变化率 $\left(\frac{\partial \Delta G}{\partial T}\right)_P = -\Delta S$ 可以推得

$$\left[\frac{\partial\left(\frac{\Delta G}{T}\right)}{\partial T}\right]_P = -\frac{\Delta H}{T^2} \text{ 或} \left(\frac{\Delta G}{T}\right)_P = -\int\frac{\Delta H}{T^2}dT + I \qquad (1.3\text{-}9)$$

由于反应焓变也随着温度变化而改变，即

$$\Delta H = \int \Delta C_P dT = \Delta C_P T + \Delta H_o \quad (1.3\text{-}10)$$

或中　ΔH_o、I——代表积分常数；

ΔC_P——代表生成物与反应物的等压热容之差。

在生物化学中温度的变化范围一般较小，若将各物质的等压热容 C_P 看作不随温度变化的常数，那么，ΔC_P 亦为常数，因此，(1.3-9)的积分公式为

$$\left(\frac{\Delta G}{T}\right) = \frac{\Delta H_o}{T} - \Delta C_P \ln T + I$$

或

$$\Delta G = \Delta H_o - \Delta C_P T \ln T + IT \quad (1.3\text{-}11)$$

只要知道某一温度(如 298.2K)下的反应焓变，即可先求出(1.3-10)式中的积分常数 ΔH_o，另从某一温度(如 298.2K)下的反应自由能变化又可得知积分常数 I。应用此式便可计算生物化学中 37℃(310.2K)时的反应自由能变化。或者使用定积分式

$$\frac{\Delta G_2}{T_2} - \frac{\Delta G_1}{T_1} = \Delta H_o\left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}\right) - \Delta C_P\left(\ln\frac{T_2}{T_1}\right) \quad (1.3\text{-}12)$$

1.3.2　生成自由能与反应自由能计算

自由能是一个很重要的状态函数，它不仅能在等温等压下判定反应是否能够进行，而且可用于计算表达反应进行程度的平衡常数等有用参数。但它与焓一样是无法知道系统内物质的绝对自由能，而是以规定物质的生成自由能来计算反应的相对自由能变化的。生成自由能的定义是：在标准态[压力为 100kPa(旧的为 1 大气压)、参考温度为 298.2K]下，由最稳定的单质生成某化合物时的自由能变化值为该化合物的标准生成自由能 $\Delta G^{\ominus}_{f\,298.2K}$(参见表 1-1)。于是规定在标准态下最稳定单质的生成自由能为零。若已知反应物和产物的生成自由能，即可通过以下公式计算：

$$\Delta G^{\ominus}_{298.2K} = \sum(\Delta G^{\ominus}_f)_{产物} - \sum(\Delta G^{\ominus}_f)_{反应物} \quad (1.3\text{-}13)$$

即所有产物的生成自由能总和减去所有反应物的生成自由能总和，就可以得到在该条件下的反应自由能变化。

在以水为溶剂的多组分系统中,物质的生成自由能有进一步的规定,也就是说,在 100 kPa(旧的为 1 大气压)和 298.2K 的水溶液中物质的有效浓度为 1 摩尔/升(物质的量浓度 c=1 摩尔/升),指定单位活度(即活度 $a=1$ 假想标准态)时,规定 H^+(aq)的 $\Delta H_f^\ominus$、$\Delta G_f^\ominus$ 和 $S^\ominus$ 为零,从而得到其它物质的生成自由能,可见表 1-4。

表 1-4　标准态下水溶液中某些物质的热力学数据***

水溶液中物质	$\Delta H_f^\ominus$ 千焦/摩尔	$\Delta G_f^\ominus$ 千焦/摩尔	$S^\ominus$ 焦/开·摩尔
H^+(aq*)	0	0	0
H^+(aq,10^{-7}mol/L)**		−41.3	
H_3O^+(aq)	−285.85	−237.19	69.96
OH^-(aq)	−229.95	−157.27	−10.54
CO_2(aq)	−412.92	−386.22	121.3
H_2CO_3(aq)	−698.7	−623.42	191.2
HCO_3^-(aq)	−691.11	−587.06	95.0
CO_3^{2-}H(aq)	−676.26	−528.10	−53.1
CH_3COOH(aq)	−488.44	−399.61	—
CH_3COO^-(aq)	−488.86	−372.46	—
NH_3(aq)	−80.83	−26.61	110.0
NH_4^+(aq)	−132.80	−79.50	112.84
H_3PO_4(aq)	−1289.5	−1147.2	176.1
$H_2PO_4^-$(aq)	−1302.5	−1135.1	89.1
HPO_4^{2-}(aq)	−1298.7	−1094.1	−36.0
PO_4^{3-}(aq)	−1284.1	−1025.5	−218.0
HCl(aq)	−167.44	−131.17	55.2
Cl^-(aq)	−167.44	−131.17	55.2
乳酸离子(aq)	—	−517.8	—
丙酮酸离子(aq)	—	−474.6	—
琥珀酸二价阴离子(aq)	—	−690.2	—
甘油(aq,1mol/L)	—	−488.5	—
草酰乙酸二价阴离子(aq)	—	−797.6	—

* (aq)表示在水溶液中;

* * 生物化学中常用的 H^+(aq)浓度为 10^{-7}mol/L,于是表中添加了该浓度的数据;

* * * 有效浓度是 1C 时,指定为单位活度。

标准态下 H^+(aq)的 $\Delta H_f^\ominus$、$\Delta G_f^\ominus$ 和 $S^\ominus$ 规定为零。

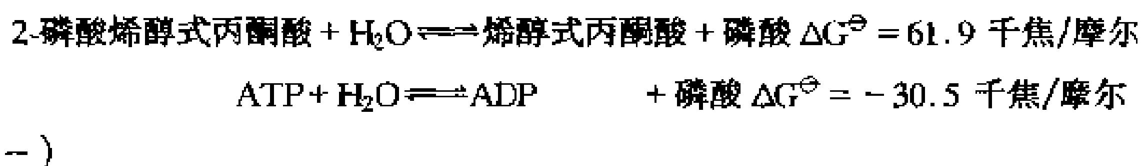
现以计算草酰乙酸二价阴离子在水溶液中转化为丙酮酸阴离子的标准自由能变化为例：


草酰乙酸$^{2-}_{(aq)}$ + H^+(aq, 10^{-7}mol/L) → CO_2(aq) + 丙酮酸$^{-}_{(aq)}$

$\Delta G^{\ominus}_{298.2K} = (-474.6) + (-386.22) - (-797.6) - (-41.3)$

$= -21.9$ 千焦

若某一反应可以通过其它几个反应组合而成，那么其反应自由能变化也可由其它几个反应的自由能变化用代数和求得。例如，2-磷酸烯醇式丙酮酸和腺苷二磷酸(ADP)反应，变为烯醇式丙酮酸和腺苷三磷酸(ATP)的反应自由能变化，可由 2-磷酸烯醇式丙酮酸的水解反应和腺苷三磷酸(ATP)的水解反应等自由能变化值代数和求得，即

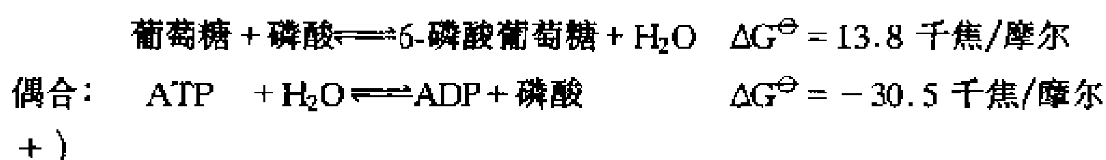

2-磷酸烯醇式丙酮酸 + H_2O ⇌ 烯醇式丙酮酸 + 磷酸 $\Delta G^{\ominus} = 61.9$ 千焦/摩尔

ATP + H_2O ⇌ ADP + 磷酸 $\Delta G^{\ominus} = -30.5$ 千焦/摩尔

−)


2-磷酸烯醇式丙酮酸 + ADP ⇌ 烯醇式丙酮酸 + ATP $\Delta G^{\ominus} = -31.4$ 千焦/摩尔

假如一个反应的 $\Delta G^{\ominus} > 0$，则这个反应是不能自发进行的，例如以葡萄糖和磷酸直接反应而制得 6-磷酸葡萄糖，由于其 $\Delta G^{\ominus} = 13.8$ 千焦/摩尔，所以该设想是很难实现的。如果添加一个 $\Delta G^{\ominus}$ 很负的反应与上述反应耦合或称偶联，那么反应就可进行，即


葡萄糖 + 磷酸 ⇌ 6-磷酸葡萄糖 + H_2O $\Delta G^{\ominus} = 13.8$ 千焦/摩尔

偶合： ATP + H_2O ⇌ ADP + 磷酸 $\Delta G^{\ominus} = -30.5$ 千焦/摩尔

+)

葡萄糖 + ATP ⇌ 6-磷酸葡萄糖 + ADP $\Delta G^{\ominus} = -16.7$ 千焦/摩尔

耦合后的反应自由能变化为负值而使该反应能够进行，这已成为生物化学中葡萄糖在葡萄糖激酶和 Mg^{2+} 催化下分解代谢的无氧酵解途径之重要一步。耦合 1 摩尔高能化合物 ATP 的水解反应，对生物体提供了 30.5 千焦的自由能，若在可逆过程中能全部做出推动化学

反应的有效功，但在不可逆过程会被消耗而部分被转为热能散发了，所做出的有效功远小于其释放的自由能。于是，人们认为 ATP 是生物体内储存能量的高能化合物之一。它在生物体内可作为供能的能源以驱动那些原非自发进行的反应而参与生理代谢。

1.4 生物体内糖代谢

糖类是自然界分布最广的有机物质之一，作为重要的能源和碳源，是生物体内需要的重要成分。一切生物都有使糖类化合物在体内分解为二氧化碳和水，并放出能量而代谢的化学途径。糖在生物体内代谢成为 CO_2 和 H_2O 所放出的总能量可由燃烧热测定而求得。植物和微生物等均是从糖原（淀粉或葡萄糖等）分解中获得延续生命所需的能量。糖类代谢的中间产物尚可为转变成其它化合物如氨基酸、核苷酸、脂肪酸等提供碳原子和碳链骨架。所以糖、脂肪、蛋白质和核酸等的新陈代谢皆有密切关联而不是孤立的。机体的新陈代谢是相互协调的整体，各种代谢都是相互影响，相互依赖的。

1.4.1 糖在无氧情况下酵解

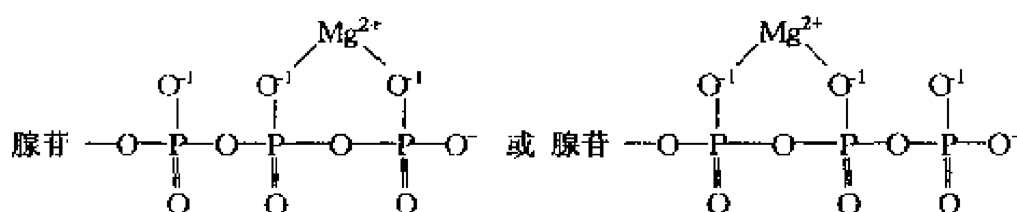
为了利用糖分子中蕴藏的能量，生物体所采用的代谢取能方式是复杂而微妙的。糖的无氧酵解是糖分解代谢的重要途径之一。葡萄糖酵解的全过程可分别由 12 个步骤来完成。

（1）葡萄糖在葡萄糖激酶和 Mg^{2+} 的催化下，被 ATP 磷酸化，生成 6-磷酸葡萄糖和 ADP，反应的 $\Delta G^{\ominus} = -16.7$ 千焦；

（2）6-磷酸葡萄糖在磷酸己糖异构酶的催化下，转化为 6-磷酸果糖，$\Delta G^{\ominus} = 1.67$ 千焦；

（3）6-磷酸果糖在磷酸果糖激酶和 Mg^{2+} 的催化下，被 ATP 磷酸化，生成 1,6-二磷酸果糖与 ADP，其 $\Delta G^{\ominus} = -14.2$ 千焦。

若糖原作为起始物质，再由磷酸葡萄糖变位酶催化而使它变位为 6-磷酸葡萄糖后，方能继续进行酵解代谢。在反应系统中 Mg^{2+} 与 ATP 可以形成络合物示意如下：



变位反应是通过磷酸葡萄糖变位酶的磷酸化型与非磷酸化型相互转变而进行的，即(以Ⓟ代表 $-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{\underset{\underset{\displaystyle OH}{|}}{P}}-OH$)



(4) 1,6-二磷酸果糖分子在醛缩酶催化下，在第3与第4碳原子之间断裂成为磷酸二羟丙酮与3-磷酸甘油醛，$\Delta G^{\ominus}=23.8$ 千焦；

(5) 磷酸二羟丙酮 $\underset{\text{催化}}{\overset{\text{磷酸丙糖异构酶}}{\rightleftharpoons}}$ 3-磷酸甘油醛，$\Delta G^{\ominus}=6.28$ 千焦；

在酵解正常进行的系统中，由于下二步反应的影响，这两种分子的同分异构之互变平衡易向生成3-磷酸甘油醛的方向转移。

(6) 3-磷酸甘油醛在3-磷酸脱氢酶的作用下和磷酸存在时，能被烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)氧化(脱氢)和酶促磷酸化，生成高能磷酸化合物1,3-二磷酸甘油酸，脱下的氢由烟酰胺腺嘌呤二核苷酸接受而成为还原型(NADH)，同时还有 H^+ 离子产生，$\Delta G^{\ominus}=6.3$ 千焦；

(7) 1,3-二磷酸甘油酸在具有可逆性磷酸甘油酸激酶和 Mg^{2+} 的催化下，生成了3-磷酸甘油酸，$\Delta G^{\ominus}=-18.8$ 千焦，并使ADP变为ATP而以高能磷酸化合物(ATP)将反应所放出的能量储存一部分下来；

每1摩尔六碳糖类在第(4)步代谢中生成了2摩尔三碳糖类之后，此反应中就有两倍具有高能磷酸键的ATP产生。

(8) 3-磷酸甘油酸通过磷酸甘油酸变位酶的磷酸化型与非磷酸

化型的互变，促使其和它们发生交换磷酸的反应，从而变为 2-磷酸甘油酸，即

3-磷酸甘油酸 + 磷酸化型酶$\rightleftharpoons$2,3-二磷酸甘油酸 + 非磷酸化型酶$\rightleftharpoons$2-磷酸甘油酸 + 磷酸化型酶　$\Delta G^{\ominus}=4.2$ 千焦；

(9) 2-磷酸甘油酸在被激活剂 Mg^{2+} 激活的烯醇化酶催化下，于第 2 与第 3 碳原子位上脱一分子(H_2O)，生成 2-磷酸烯醇式丙酮酸，$\Delta G^{\ominus}=1.67$ 千焦；

在反应中分子内部的能量重新分配，有一部分能量集中于高能磷酸键上。当机体需要时，磷酸烯醇式丙酮酸即可水解而放出标准自由能 -61.9 千焦/摩尔。

(10) 2-磷酸烯醇式丙酮酸在丙酮酸激酶的催化下，生成烯醇式丙酮酸反应是不可逆的，将第 2 个碳原子上的高能磷酸基团转移给 ADP 而形成一个储存高能的 ATP，其 $\Delta G^{\ominus}=-31.4$ 千焦；

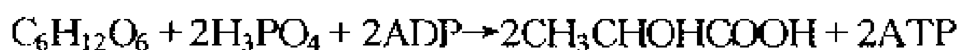
(11) 由于烯醇式丙酮酸极不稳定，很容易自发变成较稳定的丙酮酸，故丙酮酸的生成不需要酶的催化；

(12) 丙酮酸被还原成为糖类酵解的最终产物乳酸，是在乳酸脱氢酶的催化下进行的，其 $\Delta G^{\ominus}=-25.1$ 千焦；

在第(6)步 3-磷酸甘油醛脱氢时被还原所形成的 NADH 与 H^+ 参加了此还原反应，它被氧化成 NAD^+，完成了辅酶物质的再生周转。

按糖酵解的整个过程计算，一分子葡萄糖或相当于一分子葡萄糖的糖原可变成二分子乳酸($C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH$)，并以各种磷酸化物形式的演变使酵解过程方能正常运转。特别是第一步葡萄糖激酶、第三步磷酸果糖激酶和第十步丙酮酸激酶所催化的三个不可逆反应，它们是影响糖酵解的关键。

酵解的整个过程之统计是一释放能量($\Delta G^{\ominus}$约为 -135.6 千焦)过程。由于 1 摩尔葡萄糖酵解的第一步反应消耗了 ATP 1 摩尔，在第三步反应又消耗了 1 摩尔 ATP，而在第七步和第十步反应中各生成了 1×2 摩尔 ATP。于是每摩尔葡萄糖酵解成乳酸将净增 ATP 2 摩尔，也就是：



$$C_6H_{12}O_6 + 2H_3PO_4 + 2ADP \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH + 2ATP$$

1 摩尔葡萄糖在体外生成了 2 摩尔乳酸释放能量 $\Delta G^{\ominus} = -196.6$ 千焦。在体内变成乳酸过程中，机体以 ATP 生成方式捕获可供利用的能量有 30.5 千焦×2(30.5 千焦是以 1 摩尔 ATP 水解变成 ADP 和 H_3PO_4 时 $\Delta G^{\ominus} = -30.5$ 千焦为依据的)。因而 1 摩尔葡萄糖在体内酵解所释放的能量 $\Delta G^{\ominus} = -196.6 + (30.5 \times 2) = -135.6$ 千焦。所以葡萄糖酵解获能储存效率等于 $\frac{-61}{-196.6} \times 100\% = 31\%$。

从相当于 1 摩尔葡萄糖的糖原(淀粉)出发酵解可得 2 摩尔乳酸和 3 摩尔 ATP，糖原酵解获能储存效率为 $\frac{-30.5 \times 3}{-184.1} \times 100\% = 49.7\%$。

根据利用动物肌肉和酵母的实验结果指出：酵解作用在生物界具有普遍性，其生理意义主要在于释放能量，使机体在缺氧的情况下能从事生命活动。

1.4.2 糖在有氧情况下的代谢

大部分生物的糖代谢是在有氧情况下进行的，有氧氧化代谢实际上是糖的无氧分解代谢至丙酮酸后之继续，也就是说，从丙酮酸开始有氧氧化另择与无氧分解时不同的途径继续进行深度代谢，并释放能量到 $CO_2 + H_2O$ 为止。丙酮酸之后的氧化均在线粒体上进行，所以，丙酮酸后的代谢实质上也是有氧氧化从酵解中分支出来的反应(见图 1-2)。这是糖有氧氧化代谢从葡萄糖到丙酮酸经乙酰辅酶 A 而进入三羧酸循环，彻底氧化成二氧化碳和水的一系列连续反应

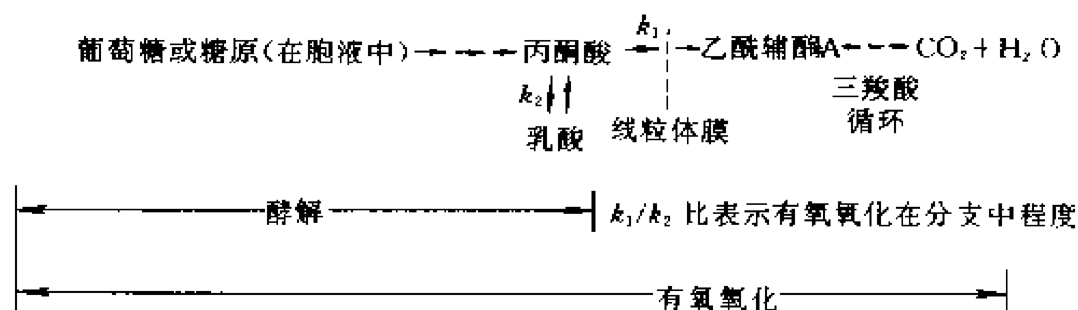
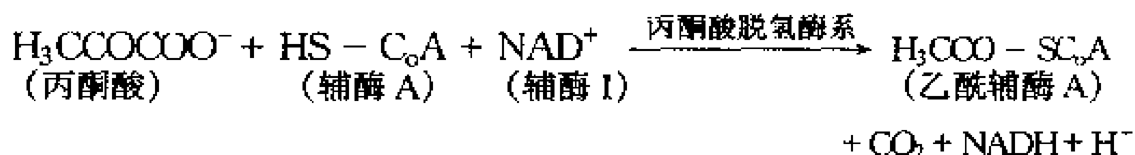


图 1-2 糖有氧氧化和酵解关系图解

所组成完整代谢途径的关键。于是，由此分几步叙述：

（1）丙酮酸迁移到线粒体膜上受丙酮酸脱氢酶系催化，进行了不可逆的氧化和脱羧反应，并与辅酶 A 结合而形成乙酸辅酶 A，即



$$\underset{(丙酮酸)}{H_3CCOCOO^-} + \underset{(辅酶\ A)}{HS-C_oA} + \underset{(辅酶\ I)}{NAD^+} \xrightarrow{丙酮酸脱氢酶系} \underset{(乙酰辅酶\ A)}{H_3CCO-SC_oA} + CO_2 + NADH + H^+$$

其 $\Delta G^{\ominus} = -33.47$ 千焦。

组成酶系的有三种酶：丙酮酸脱羧酶、硫辛酸乙酰移换酶和二氢硫辛酸脱氢酶。

参加酶系的辅酶有：硫胺素焦磷酸(TPP)、硫辛酸(S—S L)、辅酶 A、黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)和辅酶 I［烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)］。参见图 1-3。

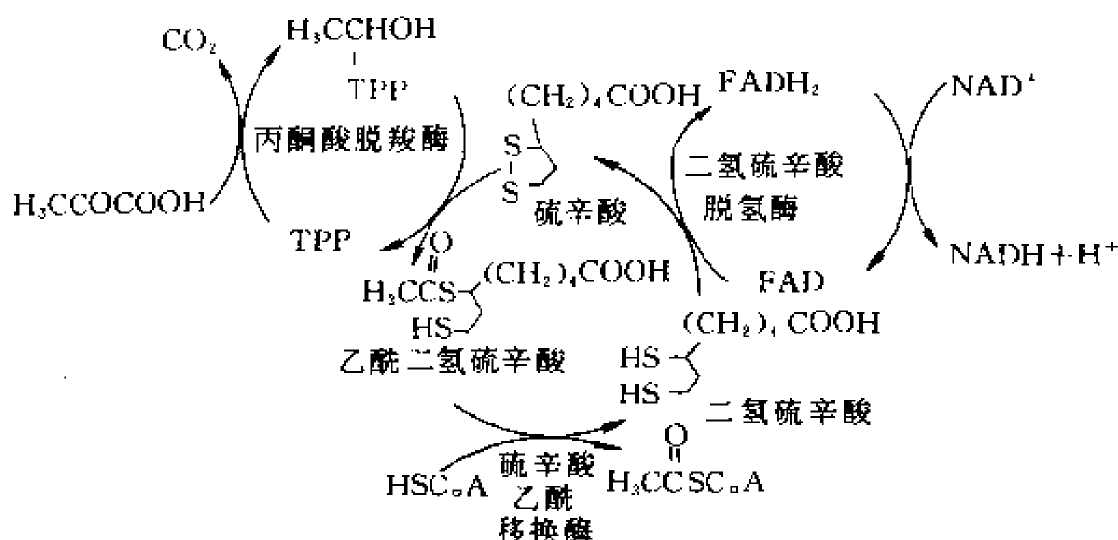


图 1-3 丙酮酸氧化与脱羧的酶系催化反应图示

（2）乙酰辅酶 A 的乙酰基通过三羧酸循环，在有氧的条件下被彻底氧化成 CO_2 和 H_2O。三羧酸循环又称柠檬酸循环，它不仅是糖有氧分解代谢的途径，也是机体内一切有机物碳链氧化成 CO_2 的必经过程。三羧酸循环由许多步骤反应所组成：

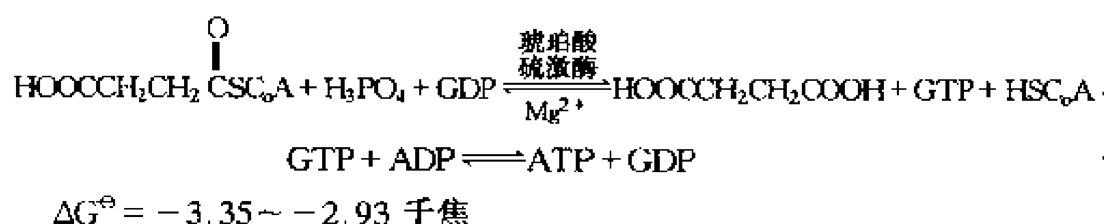
(i) 乙酰辅酶A在柠檬酸合成酶的催化下，与草酰乙酸化合后即水解而生成柠檬酸，其$\Delta G^{\ominus} = -31.38$千焦。

(ii) 当辅助因素Fe^{2+}存在时，柠檬酸在顺乌头酸酶的催化下，经顺乌头酸途径转变为异柠檬酸，$\Delta G^{\ominus}$约为$+8.37$千焦。

(iii) 在异柠檬酸脱氢酶的催化下，异柠檬酸脱去2H，经中间产物草酰琥珀酸迅速地脱羧而生成α-酮戊二酸，并放出CO_2。去氢和脱羧反应尚需辅酶NAD^+及Mg^{2+}在线粒体处进行，或者在辅酶$NADP^+$(NAD^+的磷酸化合物)及Mn^{2+}存在下，于线粒体和胞浆中进行。其$\Delta G^{\ominus}$约等于-8.37千焦。

(iv) α-酮戊二酸($HOOCCOCH_2CH_2COOH$)在硫辛酸、TPP、FAD和Mg^{2+}的存在下，与NAD^+及HSC_oA发生氧化脱羧反应，生成了琥珀酰辅酶A($HOOCCH_2CH_2\overset{O}{\overset{\|}{C}}-SC_oA$)、NADH及$H^+$，且释放了一份$CO_2$。$\Delta G^{\ominus} = -33.47$千焦，大量地释放能量使该反应成为明显的不可逆过程。

(v) 琥珀酰辅酶A于Mg^{2+}存在时经琥珀酰硫激酶的催化，将其高能硫酯键转移至二磷酸鸟苷(GDP)上而形成琥珀酸和三磷酸鸟苷(GTP)。然后GTP与ADP反应生成一个ATP，此称底物磷酸化。其反应式如下：



$$HOOCCH_2CH_2\overset{O}{\overset{\|}{C}}SC_oA + H_3PO_4 + GDP \underset{Mg^{2+}}{\overset{琥珀酸硫激酶}{\rightleftharpoons}} HOOCCH_2CH_2COOH + GTP + HSC_oA$$

$$GTP + ADP \rightleftharpoons ATP + GDP$$

$\Delta G^{\ominus} = -3.35 \sim -2.93$千焦

(vi) 琥珀酸在琥珀酸脱氢酶和辅酶FAD存在下，催化氧化为延胡索酸($HOOCCH=CHCOOH$)，FAD转成还原式$FADH_2$，可能还需要Fe^{2+}之存在，其$\Delta G^{\ominus} \approx 0$。

(vii) 延胡索酸在延胡索酸酶的作用下加水而生成苹果酸($HOOCCH_2CHOHCOOH$)，$\Delta G^{\ominus} = -3.77$千焦。

(viii) 在苹果酸脱氢酶和辅酶 NAD^+ 的作用下，苹果酸被氧化成草酰乙酸（$HOOCCH_2\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}COOH$），且有 NADH 和 H^+ 形成，$\Delta G^{\ominus}=+29.71$ 千焦。

草酰乙酸的重新形成又进入下一轮三羧酸循环和另一分子乙酰辅酶 A 反应而生成柠檬酸。每经三羧酸循环一周，就消耗了一分子乙酰辅酶 A(2C 化合物)，而三羧酸及二羧酸无增减，因此在理论上这些羧酸仅需微量即可不停息地进行循环，促使一个个分子的乙酰辅酶 A 氧化，参见图 1-4。在三羧酸循环中许多反应是可逆的，但由于柠檬酸的合成和 α-酮戊二酸的氧化脱羧是不可逆的，故此循环是

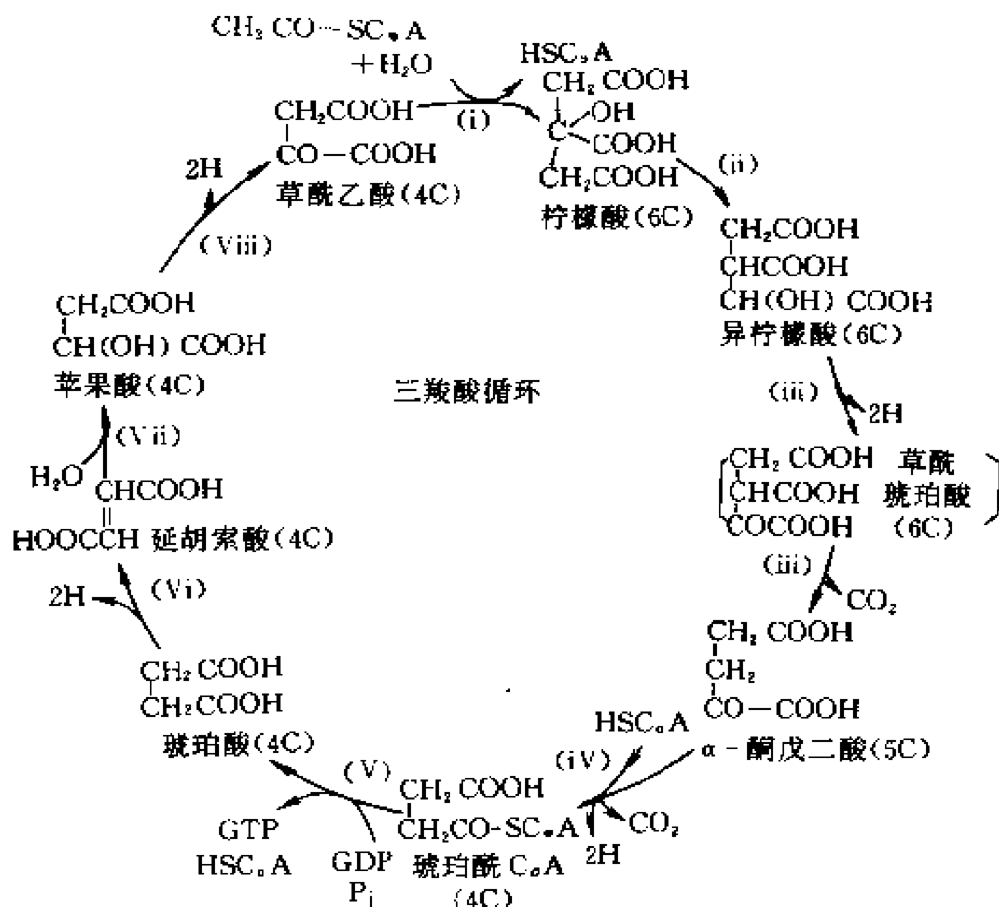


图 1-4　三羧酸循环示意

(P_i 代表磷酸)

在细胞线粒体内单方向进行着。丙酮酸所含的三个碳原子,除其中之一已在进入循环前形成乙酰辅酶 A 时即先被氧化产生一分子 CO_2 外,其它二个碳原子分别在三羧酸循环内的(iii)与(iv)步反应时被氧化,共生成了二分子 CO_2。总之,丙酮酸发生氧化反应而脱羧,随后在三羧酸循环中进行上述的(iii)、(iv)、(vi)和(viii)步骤的反应而各脱出一对氢原子,并传给了 NAD^+ 和 FAD,经呼吸链由氧接受生成水。

葡萄糖有氧代谢($C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$)时,其所释放的自由能 $\Delta G^{\ominus} = -2870.2$ 千焦/摩尔。这说明在机体内不会骤然全部释放,而一些释放自由能的过程往往与一些吸收能量的过程相耦合而作出有效功以驱动代谢反应之进行。高等生物活动所需要的自由能,主要是来自羧酸循环提供的。在机体内的糖有氧代谢各步骤反应中所脱去的 H,当它与 O 化合成水分子时,均耦联着 ADP 转变为 ATP 的磷酸化反应。因而糖有氧氧化过程中所释放的大量能量大部分是以 ATP 等高能磷酸化合物的形式保存,然后才供给机体利用。

实验结果表明,在氧化分解反应中脱去的 H 经 NAD^+ 或 $NADP^+$ 等传递至氧时,可以生成 3 个 ATP,若经 FAD($FAD \rightarrow FADH_2$)或黄素单核苷酸($FMN \rightarrow FMNH_2$)等传递至氧时可生成 2 个 ATP。因此 1 摩尔葡萄糖在有氧代谢过程中统计所产生的 ATP 摩尔数如下(每摩尔 ATP 蕴藏能量以水解自由能释放 30.5 千焦计算):即每摩尔葡萄糖在机体内彻底氧化时净产生 38 摩尔 ATP(自糖原开始,每个葡萄糖单位净得 39 摩尔 ATP)。对比无氧之酵解,可知糖的有氧代谢为机体提供更多能够被利用的自由能。其能量储存率为 $\frac{30.5 \times 38}{2870.2} \times 100\% = 40.4\%$。

糖的有氧代谢及三羧酸循环还可能是造成生物体内振荡现象的原因之一。

羧酸循环是在鸽的横纹肌和肝中得到证实而提出来的，现已得

反　应		消耗	反应产生	H传递中产生	能量（千焦）
酵解	葡萄糖→6-磷酸葡萄糖	-1			失 30.5
	6-磷酸果糖→1,6-二磷酸果糖	-1			失 30.5
	3-磷酸甘油醛→1,3-二磷酸甘油酸			3×2	获 183
	1,3-二磷酸甘油酸→3-磷酸甘油酸		1×2		获 61
	2-磷酸烯醇式丙酮酸→烯醇式丙酮酸		1×2		获 61
丙酮酸氧化脱羧	丙酮酸→乙酰辅酶 A			3×2	获 183
	异柠檬酸→草酰琥珀酸			3×2	获 183
	α-酮戊二酸→琥珀酰辅酶 A			3×2	获 183
	琥珀酰辅酶 A→琥珀酸		1×2		获 61
	琥珀酸→延胡索酸			2×2	获 122
	苹果酸→草酰乙酸			3×2	获 183
		总计净产生 38 摩尔			获 1159

知生物界(包括动物、植物和微生物)中普遍都存在着羧酸循环途径，它的重要性不仅是供给生物体能量，而且还是糖、脂肪、蛋白质三大物质转化的枢纽。循环中所产生的各种重要中间产物可为细胞生物合成多种化合物提供碳骨架，有的有机酸如柠檬酸和苹果酸等也是某些植物果实中积累物质。

1.4.3 糖代谢的其它途径

糖的无氧酵解和有氧氧化代谢是生物体内糖分解代谢的主要途径，但并非是唯一的途径，在实践中尚发现糖的其它代谢途径。

(一) 乙醛酸循环

在实验中发现，许多微生物如大肠杆菌、固氮菌等能够利用乙酸作碳源来滋养机体，它们有两种特异的酶(苹果酸合成酶和异柠檬酸裂解酶)，促使糖分解代谢在羧酸循环中另辟一条途径进行，成为羧

酸循环支路。由于中间代谢物是乙醛酸，故又称乙醛酸循环，可参见图 1-5。

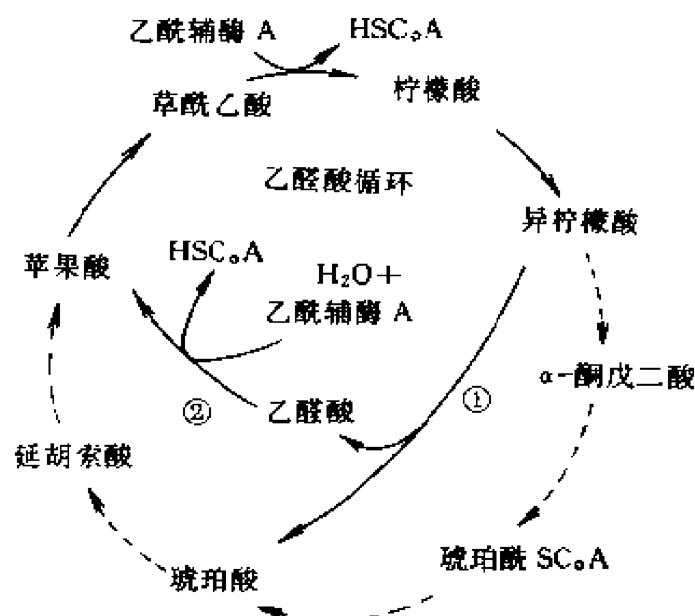
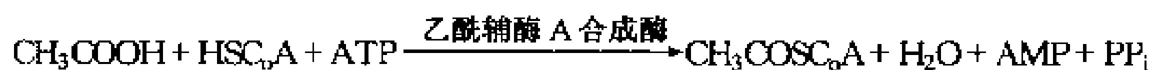


图 1-5　乙醛酸循环(三羧酸循环支路)

①异柠檬酸裂解酶；②苹果酸合成酶。

乙酸在乙酰辅酶 A 合成酶与 ATP 及辅酶 A 参与下可活化成乙酰辅酶 A，即



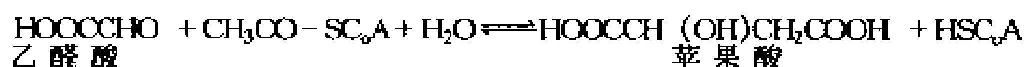
$$CH_3COOH + HSC_oA + ATP \xrightarrow{\text{乙酰辅酶 A 合成酶}} CH_3COSC_oA + H_2O + AMP + PP_i$$

然后经羧酸循环前几步骤反应变成异柠檬酸。于是在异柠檬酸裂解酶催化下，生成乙醛酸与琥珀酸，从而构成一条羧酸循环中的支路，即



$$\text{HOOCCH}_2\text{CH(COOH)CH(OH)COOH} \xrightarrow{\text{异柠檬酸裂解酶}} \underset{\text{乙醛酸}}{\text{HOOCCHO}} + \underset{\text{琥珀酸}}{\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}}$$

乙醛酸与乙酰辅酶 A 在苹果酸合成酶催化下合成苹果酸，也就是：



$$\underset{\text{乙醛酸}}{\text{HOOCCHO}} + \text{CH}_3\text{CO}-\text{SC}_o\text{A} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \underset{\text{苹果酸}}{\text{HOOCCH(OH)CH}_2\text{COOH}} + \text{HSC}_o\text{A}$$

综上所述，乙醛酸循环的总反应是：



$$2CH_3CO-SC_oA + 2H_2O + NAD^+ \rightarrow HOOCCH_2CH_2COOH + 2HSC_oA + NADH + H^+$$

从乙酸开始的乙醛酸循环总反应是：



$$2CH_3COOH + NAD^+ + 2ATP \rightarrow HOOCCH_2CH_2COOH + NADH + H^+ + 2AMP + 2PP_i$$

式中　AMP——代表腺苷 5′- -磷酸；

　　　PP_i——代表无机焦磷酸。

每摩尔乙酸开始进入羧酸循环需消耗 1 摩尔 ATP，在羧酸循环中由异柠檬酸进入支路后，只有 1 摩尔琥珀酸参与羧酸循环却能产生 8 摩尔 ATP 和 1 摩尔苹果酸。

（二）磷酸戊糖途径

在实验中发现，许多微生物和动物组织中，特别是在植物组织中普遍地存在另有糖分解代谢途径，此过程大致如图 1-6 所示。其主要特点是葡萄糖(6C，己糖)直接脱氢和脱羧而形成 5-磷酸核酮糖等 5C 戊糖后，在转酮醇酶和转醛醇酶的作用下，再进一步代谢，所以将此途径称作糖代谢的磷酸戊糖途径，又可称为磷酸己糖支路。但发现此途径的后阶段反应并非如图 1-6 所示的那样简单，反应过程中尚有多种新的中间产物生成，这说明过程的后阶段尚未完全了解清楚。

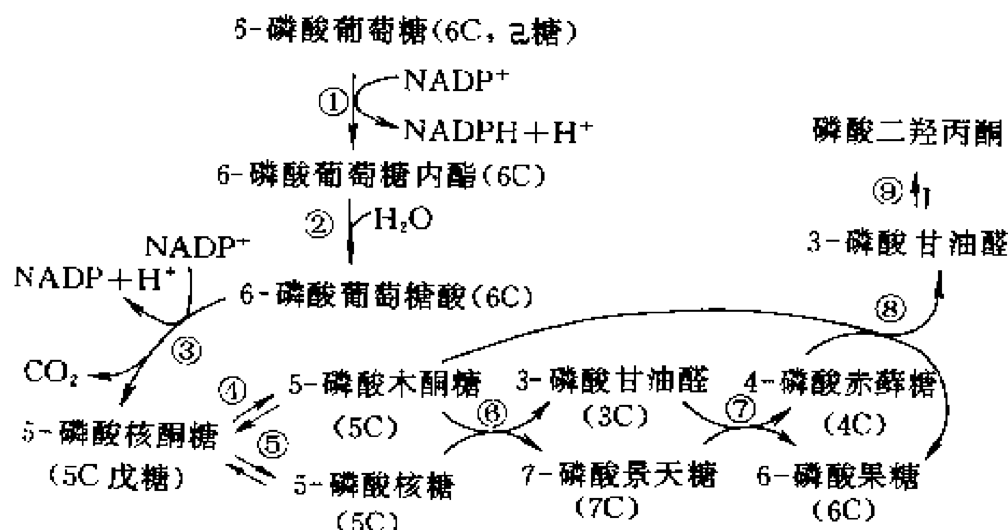


图 1-6　磷酸戊糖代谢途径

①与③ 6-磷酸葡萄糖脱氢酶　② 内脂酶　④ 表异构酶　⑤ 异构酶

⑥与⑧ 转酮醇酶又称转羟乙醛酶　⑦ 转醛醇酶又称转二羟丙酮基酶

⑨ 磷酸丙糖异构酶

磷酸戊糖途径是与糖的有氧和无氧分解代谢两种途径相联系的。磷酸甘油醛成为上述三种途径的关联点。在此途径中6-磷酸葡萄糖脱氢酶所需的辅酶是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸($NADP^+$),所产生的5-磷酸核糖,也是核酸生物合成的必需原料。由于生成的6-磷酸果糖可转化为6-磷酸葡萄糖而显出循环机制性质,所以也有称之为磷酸戊糖循环。一个葡萄糖分子每循环一次仅脱去一个羧基而放出一分子 CO_2,以及脱两次氢原子而形成两组 $NADPH + H^+$。按此支路统计,六碳葡萄糖分解代谢产生了6分子 CO_2,其反应为



$$6(6\text{-磷酸葡萄糖}) + 6O_2 \rightarrow 5(6\text{-磷酸葡萄糖}) + 6CO_2 + 5H_2O + H_3PO_4$$

经过一次循环又生成五个6-磷酸葡萄糖分子。这里可有6摩尔ATP储存了循环中1摩尔葡萄糖彻底氧化所释放的部分能量。

1.5 脂类物质的代谢能量

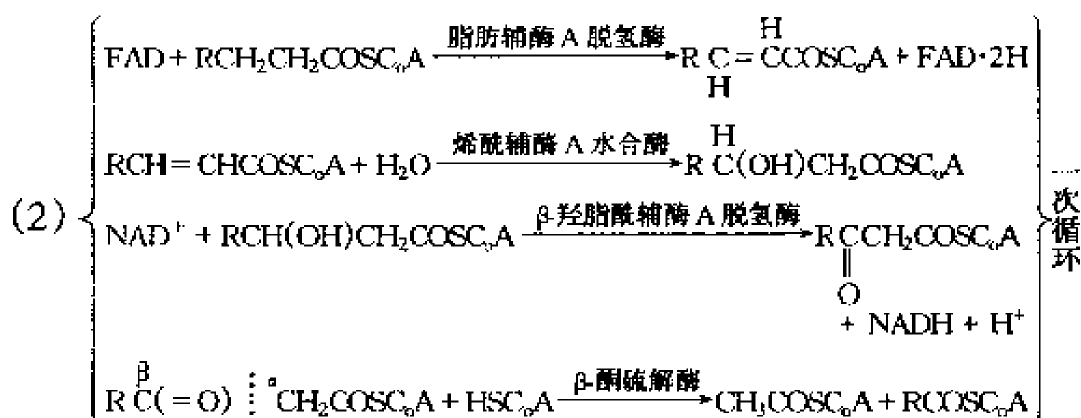
脂肪也是生物体内的一种能量贮藏形式,通常,1摩尔脂肪酸例如棕榈酸 $C_{16}H_{32}O_2$ 完全氧化生成 CO_2 和 H_2O 时所释放的能量为 $\Delta H = -9764.8$ 千焦,而每摩尔葡萄糖完全氧化所释放的能量 ΔH 为 -2884.2 千焦。由此可见,脂肪酸所包含的能量颇多。

1.5.1 脂肪酸β-氧化分解的能量转移

脂肪酸来自脂肪酸甘油酯的水解,它是由一组脂肪酶催化而进行的反应所得。生物体内脂肪酸氧化分解的主要方式是"β-氧化",它的基本过程是:先通过脂肪酰 C_oA 合成酶催化而活化变为脂肪酰 C_oA,然后经"β-氧化",每次β-氧化过程含有4步连续的反应,发生在脂肪酰基的β-碳上,使脂肪酰 C_oA 脱去两个碳链节而分裂出乙酰 C_oA。这β-氧化过程可连续地进行直至最后生成 CH_3COSC_oA 为止。



(1) $RCOOH + ATP + HSC_oA \xrightarrow{\text{硫激酶}} RCO-SC_oA + H_4P_2O_7 + AMP$(活化用去1个ATP)



以上(2)的 β-氧化过程可连续循环发生,每次都能形成 1 个乙酰 C_oA、1 个 $FADH_2$ 和 1 个 NADH,它们会进一步参与三羧酸循环、呼吸链和氧化磷酸化等的氧化而产生(12+2+3)=17 个分子 ATP。因此对于 1 摩尔棕榈酸,经一次活化,7 次循环的 β-氧化过程就能形成 7 摩尔 $FADH_2$、7 摩尔 NADH 和 8 摩尔乙酰 C_oA,于是扣去活化时所用去的 1 摩尔 ATP 后共产生($12\times8+2\times7+3\times7-1$)= 130 摩尔 ATP,总共能贮藏能量(水解释放能量 $\Delta G^{\ominus}=-30.5$ 千焦/摩尔计算)为 30.5 千焦×130=3965 千焦。

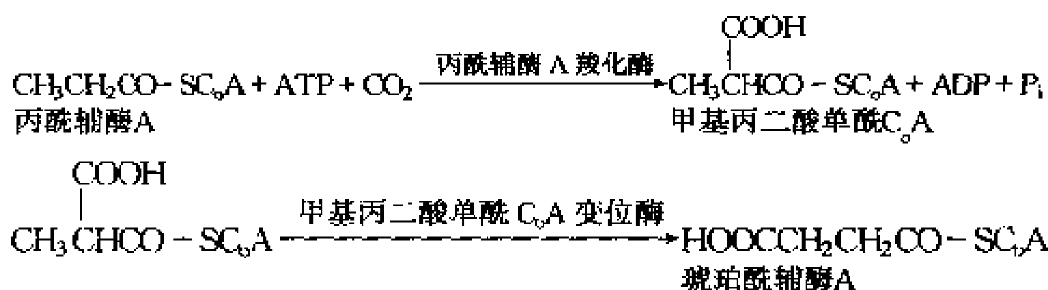
棕榈酸在生物氧化彻底分解过程中所释放的 ΔH 能量,部分消耗于供给生物体活动必需的能量之外,还有部分能量以 ΔG 形式做了有用的化学功而转移至 ATP 高能键中贮存起来。

1.5.2 奇数碳原子(C_{2n+1})脂肪酸 β-氧化贮存的能量

C_{2n+1}脂肪酸例如珠光脂酸 $C_{17}H_{34}O_2$ 在通过 β-氧化 7 次循环后,可分裂生成 7 个乙酰 C_oA 和最后生成 1 个丙酰辅酶 A。对比上述软脂酸的 β-氧化过程,1 个珠光脂酸在 7 次循环过程中的代谢分解与其相类似,即每次循环形成 1 个乙酰辅酶 A、1 个 $FADH_2$ 和 1 个 NADH。因此,1 个 17 碳的脂肪酸经 1 次活化和 7 次循环的 β-氧化过程就能形成 7 个 $FADH_2$、7 个 NADH 和 7 个乙酰 C_oA,每次循环后所生成的乙酰 C_oA、$FADH_2$ 和 NADH 再进一步经三羧酸循环、呼吸链和氧化磷酸化氧化,会生成(12+2+3)=17 个分子的 ATP,则综合 7 次循环总共可产生($7\times2+7\times3+7\times12-1$)=118 个分子

的 ATP。每摩尔珠光脂酸的这一能量转移过程可以由 ATP 贮存了 3599 千焦。

C_{2n+1}珠光脂酸经 β-氧化分解过程最后剩下的是丙酰 C_oA，它在体内需通过下述的酶催化反应变为琥珀酰 C_oA，然后进入三羧酸循环彻底氧化。

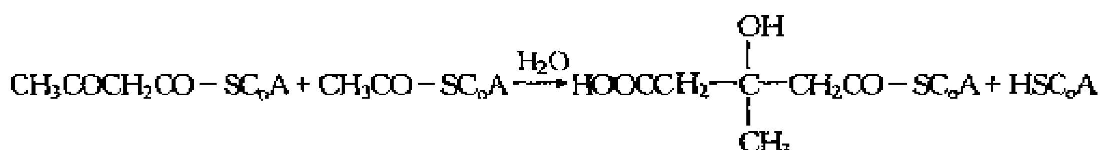


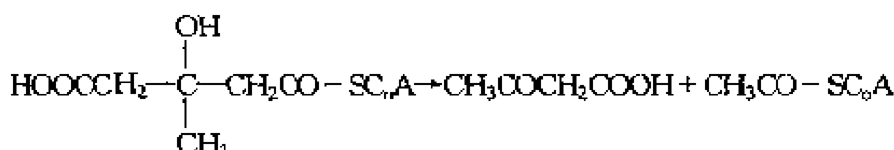
1 分子琥珀酰 C_oA 在三羧酸循环中可形成 6 分子 ATP，减去羧化反应消耗 1 分子 ATP 后，实际又形成 5 分子 ATP。所以每摩尔珠光脂酸在琥珀酰 C_oA 彻底氧化代谢后还蕴藏了 152.5 千焦的 ΔG 能量。

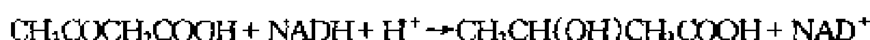
不过，甲基丙二酸单酰 C_oA 变位酶在催化甲基丙二酸单酰 C_oA 变位反应时需要维生素 B_{12}为辅酶。当缺乏维生素 B_{12}而贫血时，在尿中往往出现甲基丙二酸，这也造成 ΔG 能量的损失。

实际上，乙酰 C_oA 的氧化代谢要复杂得多。脂肪酸氧化时所分裂出来的乙酰 C_oA 在动物体内除了一部分进入三羧酸循环直接氧化外，大部分在肝内经下述反应过程有部分重新转化为乙酰 C_oA，然后进入三羧酸循环中，或者彻底氧化分解，或用于合成胆固醇等。









这些反应所生成的 β-羟丁酸、乙酰乙酸等是肝内脂肪酸代谢的正常

中间产物,统称为酮体。它们成为肝外其它组织利用能源的一种方式。如果正常人饥饿过度,或糖尿病患者,肝内生成的这些酮体就会积累,造成酮血(或尿)症,血中乙酰乙酸、β-羟丁酸浓度过高又会引起血液 pH 值下降,破坏了生物体内的酸碱平衡条件,导致常见的一种代谢性酸中毒。

结 束 语

根据热力学分析,生命过程伴随着能量代谢,需要摄入体内的糖(淀粉)、脂肪等在代谢过程中所提供的能量,一部分储存于生物合成的高能化合物(例如 ATP 等)中,另一部分以自由能 ΔG 形式供生命过程做功(包括各种运动)及与某些生物合成过程偶联。还有部分能量以焓的形式放出,从而维持适合生命活动的体温,其 ΔH 应为负值,因为生命过程能自发地进行时,ΔG 也应为负值,按 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ 公式,可知 ΔS 为正值,即生命活动总体来说,熵变不断增加。ΔS 也有负值的情况,譬如各种氨基酸按指令翻译转录或合成生物体的多肽链。故生物体必须摄入适量的营养,供生命过程合成必需的生物代谢化合物,这样可导致所需营养进入体内的熵变为负值,以减少整体生命活动时熵变的增加。由此可以认为,热力学在生命活动中对能量转变和传递的平衡计算,提供了基本原理而占有极其重要的地位。

脂肪在生命过程的新陈代谢中也能代替糖类代谢而提供生活所需的能量。然而,当供应机体的糖和脂肪过量时,机体会让脂肪积累起来。所以在这种情况下机体进行运动,以消耗多余的能量,消耗的能量也有一部分与蛋白质合成所需的能量偶联。因此,开拓营养学,对能量与营养的恒算很有必要。

此外,光合作用也为生物界中的能量代谢和物质代谢提供了驱动力,这将在其它章节阐述。

然而,自然界发生的过程都是趋向不可逆的,即不可能在外界

(环境)无所改变的条件下使其过程逆转复原。虽然生物机体具有许多有序性特征,但生物机体系统的总新陈代谢过程也是单方向进行的,其内容极其复杂。概括整个机体的敞开系统而言,新陈代谢过程的不可逆性表现在两方面——能量的耗散和机体内含趋向混杂无序化(即熵增效应)。这将导致 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ 为负值。

能量耗散发生于机体内各类多种多样的分解和合成代谢过程或能量变换与传递过程中,当生物机体从环境摄取必需营养和能量,用以贮藏或做化学功时,在其代谢过程中都会将部分能量以热形式耗散;若从环境中摄取非恰当物质或不适量的营养以及未能完全排泄掉代谢的废物时,便会促使机体趋向混杂无序化。

由于熵是系统的广度性质,过程中总熵变可认为是各组成部分熵变之和,即系统和环境相互作用而引起的熵流 d_eS 与系统内部原因所造成的熵产生 d_IS 的加和。于是系统总熵变为

$$dS = d_eS + d_IS$$

对于温度为 T 的封闭系统,熵流 d_eS 与过程中 dq 的联系是 $d_eS = \frac{dq}{T}$;系统内熵产生 d_IS 永不为负值,在可逆过程中它为零,不可逆过程为正值,即 $d_IS > 0$。所以系统中发生不可逆过程时,$dS > \frac{dq}{T}$。

当系统敞开时,系统与环境间的物质流,可引出混合熵(参见第二章)ΔS_m。

$$\Delta S_m = -R\sum_j X_j \ln X_j$$

由于 j 物质的摩尔分数 X_j 的对数值为负值,系统内混合熵永为正值,表明系统内混杂无序化将引起熵增。因此,注意饮食和环境保护是很有必要的。

第二章　生物体内多组分系统的化学平衡

2.1　多组分系统的化学势

在纯液体或纯固体中，应用自由能作为最有用的参数是方便的。然而绝大多数生物化学反应皆发生于多组分系统的溶液中。溶液是一种含多种组分的单相系统，而组分是指该系统中可以独立变化的一种化学物质。只要溶液中存在化学平衡，溶液中存在的组分数常比可能存在的物种数少。例如含水、血红蛋白（Hb）和溶解氧的溶液，就有 H_2O、Hb、O_2、HbO_2、$Hb(O_2)_3$ 和 $Hb(O_2)_4$ 等物种存在，如果 O_2 与 Hb 的结合反应处于化学平衡，只有三个可独立变化的物质，即该系统的组分数是三。确定三种物质的量以及所处的温度和压力条件，该系统的状态就完全是在确定的定态。但是定态的该系统的某些广度性质之状态函数如体积、热力学能、焓、熵或自由能等，往往不是与物质量一样具有简单的加和性，最易觉察到的是混合时的体积变化。若把少量的组分 i 加到溶液内，其广度性质发生的变化不仅依赖于所加入的物质量和性质，而且还依赖于分子间作用有变化的混合溶液组成。因此，引入偏摩尔量和偏比量是必要的。

2.1.1　偏摩尔量与化学势

定义广度性质的偏摩尔量 $\overline{X}$ 为

$$\overline{X}_i = \left(\frac{\partial X}{\partial n_i}\right)_{T,P,n_j} \tag{2.1-1}$$

式中　$\overline{X}_i$——代表偏摩尔体积 $\overline{V}_i$、偏摩尔热力学能 $\overline{U}_i$、偏摩尔焓 $\overline{H}_i$、偏摩尔熵 $\overline{S}_i$ 和偏摩尔自由能 $\overline{G}_i$ 等；

n_i——代表 i 的物质的量，摩尔。

上述的偏摩尔自由能又常称为化学势 μ_i，其物理意义是：在等温等压下的大量系统中，除了 i 组分以外，保持其它组分的数量不变(即注脚 n_j，它的 j 代表除 i 以外的其它组分)，加入 1 摩尔 i 时所引起系统自由能的改变，或者在有限量系统中其它组分不变的条件下，加入微量 dn_i 摩尔的 i 后，系统自由能改变 dG 与 dn_i 的比值。这就是 i 物质的偏摩尔自由能，其它的偏摩尔量的含意依此类推。它们由于是广度性质除以广度性质，所以已转变为强度性质，故与系统的大小无关。不过，在此只有偏摩尔自由能成为化学势 μ_i，即

$$\overline{G}_i=\left(\frac{\partial G}{\partial n_i}\right)_{T、P、n_j}=\mu_i \tag{2.1-2}$$

偏比量 $$\overline{X}_i=\left(\frac{\partial X}{\partial g_i}\right)_{T、P、g_j} \tag{2.1-3}$$

式中　g_i——代表 i 组分的克数。

在大分子化学里往往不知相对分子质量，就常用克单位。

假定制备溶液总是按最终混合物的组成比例将 y 个组分以无限小增量 dn 加进溶液里，则最终溶液的总自由能就是把所有组分的偏摩尔自由能加和，从而得到真溶液的自由能加和规则，即

$$G=\sum_{i=1}^{y}n_i\mu_i \tag{2.1-4}$$

当系统状态如 T、P 和组分摩尔量发生一个极微小的可逆变化时，则

$$\begin{aligned}dG &= \left(\frac{\partial G}{\partial T}\right)_{P、n_i}dT+\left(\frac{\partial G}{\partial P}\right)_{T、n_i}dP+\left(\frac{\partial G}{\partial n_1}\right)_{T、P、n_2\cdots n_i}dn_1\\ &\quad+\left(\frac{\partial G}{\partial n_2}\right)_{T、P、n_1、n_3\cdots n_i}dn_2+\cdots+\left(\frac{\partial G}{\partial n_i}\right)_{T、P、n_j}dn_i\\ &=-SdT+VdP+\sum_i\mu_i dn_i\end{aligned} \tag{2.1-5}$$

在 T 和 P 不变时，上式即变成

$$dG=\sum_i\mu_i dn_i \tag{2.1-6}$$

由(2.1-4)公式微分，可以得到 dG 的另一表达式，即

$$dG = \sum_i \mu_i dn_i + \sum_i n_i d\mu_i \quad (2.1\text{-}7)$$

比较(2.1-6)与(2.1-7)两公式,则得

$$\sum_i n_i d\mu_i = 0 \quad (2.1\text{-}8)$$

上述公式称 Gibbs-Duhen 方程,它说明溶液中各种物质化学势的变化是相互牵连和相互依赖的。当系统中一个组分的化学势发生变化时,则其它组分的化学势将发生相反等量的变化。

化学势在生物物理化学中的重要性,主要在于它可应用在许多机体内的相平衡和化学平衡,量度系统内某一组分的量发生极微小可逆变化时的自由能变化量。

2.1.2 溶质浓度与溶剂化学势的关系

对于混合时组分间不发生相互作用之变化的,其混合组分的熵变可应用(1.2-10)公式

$$\Delta S_m = -R\sum_{i=1}^{y} n_i \ln X_i$$

这是理想溶液的混合熵。由于理想溶液的 $\Delta H_m = 0$,所以

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m = RT\sum_i^{y} n_i \ln X_i \quad (2.1\text{-}9)$$

此公式用于实际溶液时还需校正。混合自由能又可由下列公式定义

$$\Delta G_m = G_{溶液} - \sum_i G_{i\ 纯组分} \quad (2.1\text{-}10)$$

参照(2.1-4)公式,并以 μ_i^* 表示纯物质的化学势即其摩尔自由能,应该有一个绝对值,但无法测出。现以稳定单质作基准的相对值作为标准生成自由能,则

$$\Delta G_m = \sum_i n_i \mu_i - \sum n_i \mu_i^{\ominus} \quad (2.1\text{-}11)$$

于是

$$\sum_i n_i(\mu_i - \mu_i^{\ominus}) = RT\sum_i n_i \ln X_i$$

因为溶液中的组分是指独立变化的,故有

$$\mu_i - \mu_i^{\ominus} = RT\ln X_i \quad (2.1\text{-}12)$$

若讨论大分子的一些性质如渗透压等，需溶剂（如水等）的化学势。对以摩尔分数浓度表示的稀溶液来说，通常是把 100 kPa（旧的为 1 大气压）下的纯溶剂作为溶剂的标准态最为方便。在二组分系统中可设 X_1 和 X_2 分别表示溶剂和溶质的摩尔分数，那么 $X_1 = 1 - X_2$。从（2.1-12）式，溶剂的化学势可以写成下式：

$$\mu_1 - \mu_1^{\ominus} = RT\ln X_1 \tag{2.1-13}$$

当稀溶液的 X_2 很小的情况下，$\ln X_1 = \ln(1 - X_2) \approx -X_2$，因此

$$\mu_1 - \mu_1^{\ominus} = -RTX_2 \quad 或\ \mu_1 = \mu_1^{\ominus} - RTX_2 \tag{2.1-14}$$

上式表明，溶剂的化学势在加入溶质后，会减少 RTX_2 数值。在极稀溶液中 X_2 很容易化为用溶质的体积浓度 C_2（克/升）表示，即

$$X_2 \approx \frac{C_2\widetilde{V}_1}{M_2} \tag{2.1-15}$$

式中 M_2——代表溶质的数均摩尔质量（旧称分子量）；

$\widetilde{V}_1$——代表纯溶剂的摩尔体积。

于是，（2.1-14）式还可写成

$$\mu_1 = \mu_1^{\ominus} - \frac{RT\,\widetilde{V}_1 C_2}{M_2} \tag{2.1-16}$$

对于一个双组分系统，可明显地从上式看出溶质浓度对溶剂化学势的影响。

2.1.3 相平衡与膜渗透

设系统内有 α 和 β 两相，在两相中均不仅有一种物质，若在等温等压下，β 相有极微量的第 i 种物质转移到 α 相中，此时系统自由能的总变化根据（2.1-8）式可得

$$dG = dG^{\alpha} + dG^{\beta} = \mu_i^{\alpha}dn_i^{\alpha} + \mu_i^{\beta}dn_i^{\beta}$$

由于 α 相得到的量等于 β 相所失的，即 $dn_i^{\alpha} = -dn_i^{\beta}$。倘若系统处于平衡时进行无限小量转移，则 $dG = 0$，所以

$$(\mu_i^{\alpha} - \mu_i^{\beta})dn_i^{\alpha} = 0 \tag{2.1-17}$$

因 $dn_i^{\alpha} \neq 0$，则必是 $\mu_i^{\alpha} = \mu_i^{\beta}$ (2.1-18)

这表示 i 组分在 α、β 两相中分配达到平衡的条件是该组分在两相中的化学势相等。

若上述 i 组分的转移是自发的，就需 $(dG)_{T,P}<0$。由此可见，只有 $\mu_i^\beta>\mu_i^\alpha$ 才能促使 i 组分从 μ_i 较大的相自发地流向 μ_i 较小的相，直到 i 物质在两相中的 μ_i 相等时达到平衡。

化学势在相平衡中的应用已作为解决多数膜平衡问题的基础。细胞和细胞器都由半透膜分界，一般把膜外和膜内比作两相，半透膜可让某些分子自由扩散，而另一些分子不能通过。

如果对溶剂和溶质皆有渗透性的膜，开始时内侧放置葡萄糖溶液而在外侧放纯水，葡萄糖溶液中的水因溶质浓度影响使其化学势比纯水低，导致水分子由外侧向内侧方向自发地流动，而葡萄糖分子朝相对方向渗透扩散。最后在膜两侧的葡萄糖和水的摩尔分数相等，使每个组分在膜两侧各自的化学势相等即达到平衡状态。

假如应用仅对溶剂有渗透性的膜，例如膜内是溶质蛋白质的水溶液而外侧是溶剂纯水，由于蛋白质分子太大而不能透过膜，这是生物膜的普遍现象，现只有水分子可由外侧流向含蛋白质的内侧，于是含有蛋白质的溶液的水量将不断地增加。因容器被密闭，所以这会导致溶液一侧的压力升高，最后压止了水分子的单向渗透扩散，使膜两侧的水之化学势相等而系统达到了平衡。溶液中水的较低化学势因产生较高压力影响化学势增高而被补偿。达到平衡时的压力差称为渗透压。渗透压是所有生命细胞呈现的一个重要特性。

从(1.3-8)式可知，溶剂的自由能随压力的变化公式可写成

$$\left(\frac{\partial\mu_1}{\partial P}\right)_T=\overline{V}_1 \tag{2.1-19}$$

式中 $\overline{V}_1$——代表溶剂的偏摩尔体积。

在膜外侧(用 β 上标代表)的纯溶剂化学势 $\mu_1^\beta=\mu_1^*$，而膜内侧(用 α 上标代表)的溶剂化学势因溶质影响使其降低，又由于产生静压而增加，则

$$\mu_1^\alpha=\mu_1^\beta-RTX_2+\int_{P_0}^{P_0+\pi}\overline{V}_1dP \tag{2.1-20}$$

式中 P_0 ——代表时间为零时的压力;

π ——代表平衡后增加的压力,称渗透压。

水的压缩性很小,在低压和稀溶液中,可以认为 $\overline{V}_1=\widetilde{V}_1$,上式积分得

$$\mu_1^{\alpha}=\mu_1^{*}-RTX_2+\widetilde{V}_1\pi \tag{2.1-21}$$

达到平衡时 $\mu_1^{\alpha}=\mu_1^{\beta}=\mu_1^{*}$,将它代入(2.1-21)式,则

$$\mu_1^{*}=\mu_1^{*}-RTX_2+\widetilde{V}_1\pi \quad , \quad 即\ \pi=\frac{RTX_2}{\widetilde{V}_1} \tag{2.1-22}$$

根据(2.1-15)式,渗透压也可以下式表示

$$\pi=RT\left(\frac{C_2}{M_2}\right) \tag{2.1-23}$$

渗透压 π 是使膜两侧溶剂的化学势相等时所需的压力差。它与溶质浓度成正比,而与溶质分子相对分子质量成反比。所以渗透压实验是测定纯净大分子相对分子质量的一种简便方法。

从相平衡可知,物质自低浓度区向高浓度区转移时会使自由能增加,这样的过程是不能自发进行的。然而在细胞或细胞器中常常出现物质渗过膜是由低浓度区向高浓度区传送的现象,人们称之为主动输送。例如:一个研究得较详细的生物传送系统是动物细胞内维持 K^+ 高浓度和 Na^+ 低浓度的系统,这是两种阳离子分别逆浓度梯度作单向传送的结果。由此可以推论,必然有其它反应来实现能量耦联,供给自由能而做有效功,以及其它物质与主动传送物质相结合,带动着该物质的主动输送。对此的进一步研究已经证实了上述的推论。

2.1.4 主动输送

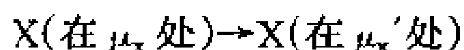
生物膜能自发并有选择地输送分子或离子自外到内或由内向外,以致造成很大的浓度差。例如,某些细菌竟然能够使蔗糖在细菌外部的浓度比内部低得多的情况下,自发地通过细胞膜而迁移至内部。

生物化学家提出第一种可能性机理,即决定自发的输送方向是

化学势的梯度。实际上，某溶质在膜的高浓度一侧，绝大多数是与传送酶等以某种方式构成复合或结合体，从而使该自由溶质可能比在膜的低浓度一侧稀得多。例如：在绝大多数的细胞中 Mg^{2+} 浓度比其周围环境的大得多，然而大多数的 Mg^{2+} 是被酶等强烈地结合着。所以这种机理所引起的行为并非真正的主动输送。在以分光光度分析法研究物质进入细胞的输送速度时，发现邻硝基苯-β-半乳糖苷(ONPG)可以通过乳糖透性酶结合体而运入细胞，然后在细胞内被β-半乳糖苷酶催化而水解为半乳糖和邻硝基酚（邻硝基酚为黄色，能用分光光度计定量测定）。大肠杆菌乳糖透性酶与乳糖结合而作为输送载体又是另一例证。

在生物膜中，红细胞阴离子输送蛋白，将呼吸组织红细胞中所积累的 CO_2 以 HCO_3^- 形式从肺毛细管迅速扩散出去，而 Cl^- 伴随着此过程进入红细胞。阴离子输送蛋白促进 HCO_3^- 和 Cl^- 交换和扩散时是以 1:1 之比例进行的。这是两种离子在膜两侧朝反方向耦联输送，称作反向输送过程。

显然，跨膜输送过程需要保持一个真正的化学势差为负自由能变化，假如该过程与化学势梯度相反，就务必由外界供给自由能，否则便不能继续进行下去。倘若将此过程与另一有更大的负自由能变化之自发过程相耦联，即实现能量耦联以推动主动输送。现假设有一摩尔物质 X 的输送，也就是



$$X(在\,\mu_x\,处) \rightarrow X(在\,\mu_x'\,处)$$

则 $$\Delta G_{输} = \mu_x' - \mu_x \qquad (2.1\text{-}24)$$

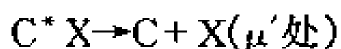
现有一反应载体，它在膜的一侧能与 X 反应：



$$C^* + X(在\,\mu\,处) \rightarrow C^*X$$

故 $$\Delta G_2 = \mu_{c*x} - \mu_{c*} - \mu_x \qquad (2.1\text{-}25)$$

然后 C^*X 透过膜，在膜的另一侧由酶催化而释放 X，即



$$C^*X \rightarrow C + X(\mu'\,处)$$

因此 $$\Delta G_3 = \mu_x' + \mu_c - \mu_{c*x} \qquad (2.1\text{-}26)$$

整个变化为

$$
\begin{aligned}
\Delta G &= \Delta G_3 + \Delta G_2 \\
&= \mu_x{}' + \mu_c - \mu_{c*x} + \mu_{c*x} - \mu_{c*} - \mu_x \\
&= (\mu_x{}' - \mu_x) + (\mu_c - \mu_{c*})
\end{aligned}
\tag{2.1-27}
$$

于是即使 $\mu_x{}' - \mu_x > 0$，若 $\mu_c - \mu_{c*}$ 是很负，且 $|(\mu_c - \mu_{c*})| \gg (\mu_x{}' - \mu_x)$ 时 ΔG 可以是负值，则由 C^* 变成 C 的自发过程推动了 X 主动输送。由于形成不稳定的活性载体本身势必要消耗自由能，所以膜必须积极地进行新陈代谢方能继续主动输送。

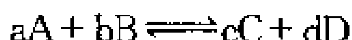
研究结果表明，$Na^+ - K^+$ ATP 酶是一种跨膜蛋白，它消耗 ATP 中 β-γ 磷酸酐键中的能量，将 Na^+ 泵出细胞外而把 K^+ 泵入细胞，化学能与浓聚输送的偶联是驱动初级主动输送和主动反向输送系统的例子。$Na^+ - K^+$ ATP 酶作用经一次循环，将 3 个 Na^+ 送出细胞，并把 2 个 K^+ 输入细胞，同时水解一分子 ATP。$Na^+ - K^+$ ATP 酶催化的这三个过程是紧密偶联的。

由初级主动输送系统产生的跨膜离子梯度本身（亦是作功的潜在能量）可以驱使其它离子或代谢物浓集，称为次级主动输送。

2.2 溶液中的化学平衡

2.2.1 化学平衡常数与 ΔG 的关系

假定有如下化学计量的化学反应：



$$aA + bB \rightleftharpoons cC + dD$$

其中的 a、b、c、d 分别代表 A、B、C、D 在浓度为 C_A、C_B、C_C 和 C_D 时的 n 摩尔。在恒温 T 和恒压 P 时，反应的自由能变化应为

$$\Delta G = G_{终态} - G_{始态} = d\mu_D + c\mu_C - a\mu_A - b\mu_B \tag{2.2-1}$$

按照(2.1-12)式，从物质的量浓度（摩尔/升）代替摩尔分数浓度时，则

$$\mu_i = \mu_i^{\ominus} + RT\ln C_i \tag{2.2-2}$$

实际上，多组分系统中的化学势公式应以活度 a_i 表示，即

$$\mu_i = \mu_i^{\ominus} + RT\ln a_i \tag{2.2-3}$$

若 i 组分的浓度为 C_i，则 $a_i = C_i\gamma_{ci}$。

式中 γ_{ci}——代表物质的量浓度的校正系数，称它为物质的量浓度的活度系数，当 $\gamma_{ci}=1$ 时才能用 c_i 代替 a_i。

上式 $\mu_i^\ominus$——代表 100 kPa(旧的为 1 大气压)下 i 物质在溶液中的浓度为 1 摩尔/升，具有单位活度之假想态，以此作为标准态的标准化学势；

μ_D、μ_C、μ_A、μ_B——分别代表 D、C、A、B、在相应物质的量浓度下的化学势。

将(2.2-3)式代入(2.2-1)式，可以得到

$$\Delta G = d\mu_D^\ominus + c\mu_C^\ominus - a\mu_A^\ominus - b\mu_B^\ominus + RT\ln\frac{a_D^d a_C^c}{a_A^a a_B^b} \tag{2.2-4}$$

在理想情况下，γ_{ci}都等于 1 时，则

$$\Delta G = d\mu_D^\ominus + c\mu_C^\ominus - a\mu_A^\ominus - b\mu_B^\ominus + RT\ln\frac{C_D^d C_C^c}{C_A^a C_B^b} \tag{2.2-5}$$

等号之后的前四项是该反应在标准态的自由能变化 $\Delta G^\ominus$，故

$$\Delta G = \Delta G^\ominus + RT\ln\frac{a_D^d a_C^c}{a_A^a a_B^b} = \Delta G^\ominus + RT\ln\frac{C_D^d C_C^c}{C_A^a C_B^b} + RT\ln\frac{\gamma_D^d\gamma_C^c}{\gamma_A^a\gamma_B^b} \tag{2.2-6}$$

或在理想情况下

$$\Delta G = \Delta G^\ominus + RT\ln\frac{C_D^d C_C^c}{C_A^a C_B^b} \tag{2.2-7}$$

当化学反应达到平衡时，$\Delta G=0$，且 $\gamma_i=1$，则

$$\frac{C_D^d C_C^c}{C_A^a C_B^b} = K_{eq} \tag{2.2-8}$$

因此 $$\Delta G^\ominus = -RT\ln K_{eq} \tag{2.2-9}$$

一个反应的平衡常数可用来计算反应自由能，已知标准态生成自由能时，也可用来计算反应的平衡常数。当反应中各种物质并非 1 摩尔/升(标准态浓度)时，可以根据(2.2-7)公式，从 $\Delta G^\ominus$和所测得的各物质浓度来计算 ΔG。

2.2.2 平衡常数与电动势

倘若系统的自由能变化按(1.3-5)式可以做出最大有效功,这有效功是驱动电子的传递,则 $\omega' = nFE^{\ominus}$,于是

$$\Delta G^{\ominus} = -nFE^{\ominus} \tag{2.2-10}$$

式中 n——代表电子的量(摩尔);

$E^{\ominus}$——代表反应组成电池后所有反应物和产物都处于标准态时观察到的电动势,往往又称为反应的标准电位;

F——代表1摩尔电子(即 6.022045×10^{23} 电子)所带的电量,其值等于 $1.6022\times10^{-19}\times6.022\times10^{23}=96485$ 焦耳/Vmol,称法拉第常数。

电动势是一种驱动电子传递的力,它的大小与电子数多少无关,正像水管中的水压,但所做的电功(或自由能变化)依赖于电子数乘电动势。将(2.2-10)式代入(2.2-7)式,即得到下式:

$$E = E^{\ominus} - \frac{RT}{nF}\ln\frac{C_D^d C_C^c}{C_A^a C_B^b} \tag{2.2-11}$$

上述公式称 Nernst 方程。当系统达到平衡状态时,$\Delta G = -nFE = 0$,则

$$E^{\ominus} = \frac{RT}{nF}\ln\left(\frac{C_D^d C_C^c}{C_A^a C_B^b}\right)_{eq} = \frac{RT}{nF}\ln K_{eq} = 2.3\frac{RT}{nF}\log K_{eq} \tag{2.2-12}$$

反应的标准电动势 $E^{\ominus}$ 与平衡常数的对数关系表明,标准电动势若发生小的变化,会导致平衡常数产生相应的大改变。

电动势可推动那些能耦联的反应进行电子转移,且可推动许多膜表面反应之进行。跨膜电位能提供推动膜表面发生反应的能量。在恒温T和恒压P条件下,对1摩尔离子j透过膜的电化学势(即化学势与静电功之和)差为

$$\Delta\bar{\mu}_j = Z_j F\Delta\psi + RT\ln\frac{C_j^{外侧}}{C_j^{内侧}} \tag{2.2-13}$$

式中 Z_j——代表带正或负号的化合价;

$\Delta\psi$——代表跨膜电位;

$C_j^{外侧}$ 和 $C_j^{内侧}$——分别代表离子j在膜结构各一侧的浓度。

若离子是 H^+, $Z=+1$, $pH=-\log(H^+)$，上式即变为

$$\Delta\bar{\mu}_{H^+}=F\Delta\psi-2.3RT\Delta pH \qquad (2.2\text{-}14)$$

2.2.3 平衡常数计算

在有生命的系统中，其反应往往都不是孤立的，而是由一系列反应组成长序列且又复杂的反应。倘若在总序列反应中，有一个平衡常数有利的反应，则其中个别平衡常数不利的反应也被带动着进行。假定 $A \rightleftharpoons B$ 平衡常数很小（如果 $K_1=0.01$）而不利于进行（$\Delta G=+$）的反应，可以与另一个平衡常数很大（$B \rightleftharpoons C$, $K_2=10^4$）有利于进行（$\Delta G^\ominus=-$）的反应耦联，即



$$A \rightleftharpoons B \rightleftharpoons C$$

当 $A \rightleftharpoons B$ 孤立存在时，$K_1=\frac{[B]}{[A]}=0.01$，只能使极少量的 A 变成 B 后就达到平衡。然而与 $B \rightleftharpoons C$ 耦联后因 $K_2=10^4$，则

$$K=K_1K_2=\frac{[B]}{[A]}\times\frac{[C]}{[B]}=\frac{[C]}{[A]}=100$$

总过程的平衡常数等于耦联的各个别反应平衡常数之乘积，致使总过程的平衡常数有利于 $A \rightleftharpoons C$ 的反应。由于 B 在后一反应中不断地消耗，破坏了前一反应的平衡，导致大多数 A 参加反应而转变为 C。

将两个反应耦合在一起同时进行，以其中一个反应推动另一反应能够发生，假定 $A \rightleftharpoons B$ 有一不利于反应的平衡常数 $K_1=0.006$，如果与一个平衡常数为 9×10^5 而十分有利的 $C \rightleftharpoons D$ 反应耦合在一起，即

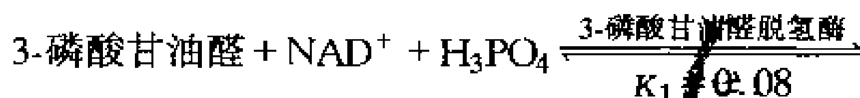


$$A+C \xrightleftharpoons{K_3} B+D$$

则 $K_1=\frac{[B]}{[A]}$, $K_2=\frac{[D]}{[C]}$, $K_3=K_1\times K_2=\frac{[B][D]}{[A][C]}=5.4\times10^3$

耦合反应的平衡常数仍是原两个反应的平衡常数乘积，相当于耦合反应的自由能变化等于原两个反应的自由能变化的代数和计算法。

例如，糖的酵解中发生如下耦联反应：

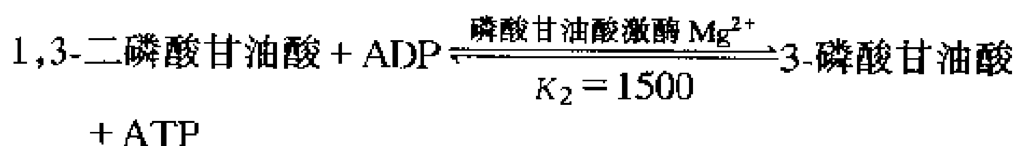


$$3\text{-磷酸甘油醛}+NAD^+ + H_3PO_4 \xrightleftharpoons[K_1=0.08]{3\text{-磷酸甘油醛脱氢酶}}$$



1,3-二磷酸甘油酸 + NADH + H^+

因与



$$1,3\text{-二磷酸甘油酸} + \text{ADP} \xrightleftharpoons[K_2 = 1500]{\text{磷酸甘油酸激酶 } Mg^{2+}} 3\text{-磷酸甘油酸} + \text{ATP}$$

耦联，$K_3 = K_1 \times K_2 = 120$，有利于 3-磷酸甘油醛氧化而生成 1,3-二磷酸甘油酸，随后继续转变成 3-磷酸甘油酸。

利用平衡常数可以计算一个反应在平衡时的反应物和生成物之浓度。例如，在 $A + B \rightleftharpoons C$ 反应中，开始时已知 A 的浓度为 A_o，B 的浓度为 B_o，设 X 是生成物 C 的平衡浓度。按上述的反应式计量，当生成 1 摩尔 C 时，务必消耗 A 和 B 各 1 摩尔。这样，A 的平衡浓度是 $A_o - X$，B 的平衡浓度是 $B_o - X$。按此反应的平衡常数表达式为

$$K = \frac{[C]}{[A][B]} = \frac{[X]}{[A_o - X][B_o - X]} \tag{2.2-15}$$

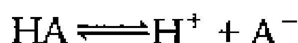
整理之后得 $KX^2 - (KA_o + KB_o + 1)X + KA_oB_o = 0$，由此可见，只要求解 X 的二次方程，即可得各物质的平衡浓度。如果平衡常数较大或较小，反应进行的时间又不长，X 与 A_o 和 B_o 相比较很小时，则 KX_2 项可忽略，这种近似的处理方法是常用的，于是

$$X = \frac{KA_oB_o}{KA_o + KB_o + 1} \tag{2.2-16}$$

假如在近似求解中发现 KX^2 项不能忽略，就只能用较复杂的方程式求解。

2.2.4 酸碱平衡

在生物化学中遇到最普遍的平衡是酸碱平衡。酸的解离反应可写作



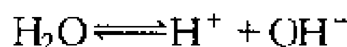
$$HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$$

其平衡常数式为

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \tag{2.2-17}$$

K_a 称为酸(解离)常数。水从解离质子方面看，可视为弱酸，其分子

解离可用以下反应式和平衡常数式表示，即



$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$$

$$K = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}$$

实际上 H^+ 是与 H_2O 分子结合成 H_3^+O。

式中　$[H^+]$——代表$[H_3^+O]$的浓度。

由于水的浓度很高，在水溶液中发生化学反应时不会引起水量的显著变化，$[H_2O]$可认为是常数而并入平衡常数中，于是得 25℃ 时水的解离常数 K_ω 为

$$K_\omega = [H^+][OH^-] = 10^{-14}(\text{摩尔/升})^2 \qquad (2.2\text{-}18)$$

在强酸溶液中，强酸完全解离成阳离子和氢离子，氢离子浓度$[H^+]$等于加入溶液的酸 HA 总浓度 C_{HA}，因此，在强酸溶液中

$$pH = -\log C_{HA} \qquad (2.2\text{-}19)$$

弱酸是不完全解离的，弱酸的解离常数按(2.2-17)式可改写为

$$pH = -\log K_a + \log\left[\frac{(A^-)}{(HA)}\right] = pK_a + \log\left[\frac{\text{碱}}{\text{酸}}\right] \qquad (2.2\text{-}20)$$

当阴离子或碱的浓度等于未解离的酸浓度时，例如酸的一半被中和(参见图 2-1)，上式即变成

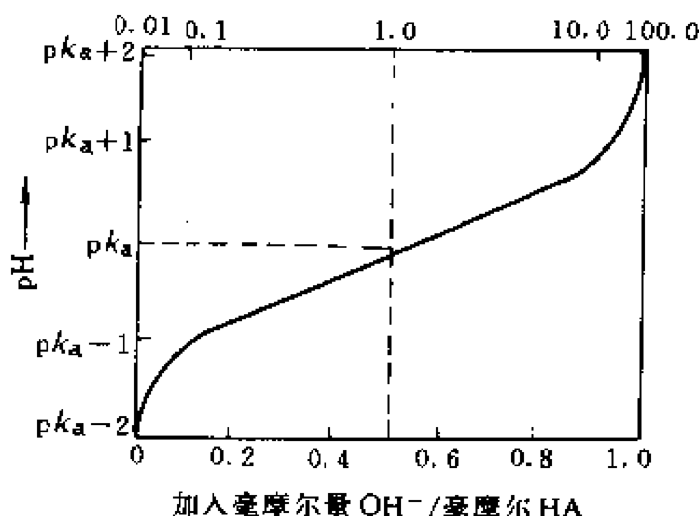


图 2-1　强碱滴定弱酸时典型的 pH 曲线

$$pH = pK_a \tag{2.2-21}$$

此时的 pH 值几乎与加入的碱或酸无关。通常在研究与溶液 pH 值有关的生物化学反应时常利用此原理制备成缓冲溶液。

在较浓的缓冲溶液中,各种离子的浓度较高,离子间力的作用较大,影响离子的化学作用能力也较大。考虑到离子间的力,有必要引入"活度"这个概念。离子的活度 a 是离子在化学反应中起作用的有效浓度。活度 a 与浓度 C 之间的比值称活度系数 γ,即

$$\gamma = \frac{a}{C} \quad 或 \quad a = \gamma C \tag{2.2-22}$$

活度系数表征离子间力的影响大小,在较稀的弱电解质溶液中,离子浓度低,离子间的力也小,活度系数接近于 1,此时可视为活度等于离子浓度。活度系数的大小不仅与溶液中各种离子浓度有关,也和离子带电荷数有关。两者一起考虑,就有必要引入溶液的"离子强度"概念,即

$$I = \frac{1}{2}(C_1Z_1^2 + C_2Z_2^2 + \cdots + C_iZ_i^2) \tag{2.2-23}$$

式中 I——代表离子强度;

C_1、C_2、…、C_i——分别代表溶液中各离子的浓度;

Z_1、Z_2、…、Z_i——分别代表各种离子所带的电荷数。

显然,离子强度越大,活度系数偏离 1 越远,于是平衡常数式中的各物质平衡浓度更需要分别使用它们的活度。

生物体内的酸碱不平衡,势必导致百病丛生,影响身体健康。

2.2.5 多级平衡中的结合现象

在生物机体中的核酸分子,尤其是在蛋白质分子上常可结合一些小分子或配体,包括底物、抑制剂和激活剂。这些配体能在一个蛋白质分子的许多结合位点上配位。例如,血红蛋白可以结合四个氧分子,血清白蛋白能利用许多位点分别结合那些具有极不相同基团的物质。一切蛋白质都可结合质子,脱氧核糖核酸(DNA)能与 Mg^{2+} 结合,这是一种生物化学上的结合现象。

假定每个大分子 A 只有一个结合位点,在大分子 A 浓度为[A]

的情况下所测得的配体 B 自由存在的浓度为[B]，以此求得结合现象中的平均结合数 $\bar{\nu}$ 就较简单得多。按定义结合数 $\bar{\nu}$ 等于结合 B 分子的总数与结合位点总数之比，即可写出 $\bar{\nu}$ 的表示式为

$$\bar{\nu}=\frac{[AB]}{[A]+[AB]} \tag{2.2-24}$$

由于每一 A 分子只有一个结合位点，所以加入溶液的 A 总量就是 [A]+[AB]的值，而[AB]值等于加入的 B 总量减去加入 A 后所测得未配位的自由 B 浓度，也就是

$$\bar{\nu}=\frac{B_{总量}-B_{未结合量}}{A_{总量}} \tag{2.2-25}$$

设一个蛋白质分子 A 上只结合一个配体 B 的简单情况，其结合平衡常数以 K_f 表示，则



$$A+B\underset{K_c}{\overset{K_f}{\rightleftharpoons}}AB \qquad K_f=\frac{[AB]}{[A][B]} \tag{2.2-26}$$

于是可用 K_f 或其解离常数 $K_d\left(K_f=\frac{1}{K_d}\right)$ 来计算 $\bar{\nu}$，即

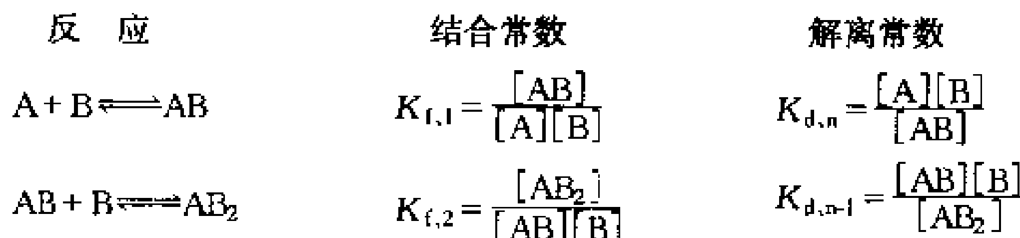
$$\bar{\nu}=\frac{K_f[B]}{1+K_f[B]}=\frac{[B]}{[B]+K_d} \tag{2.2-27}$$

两边写成倒数形式

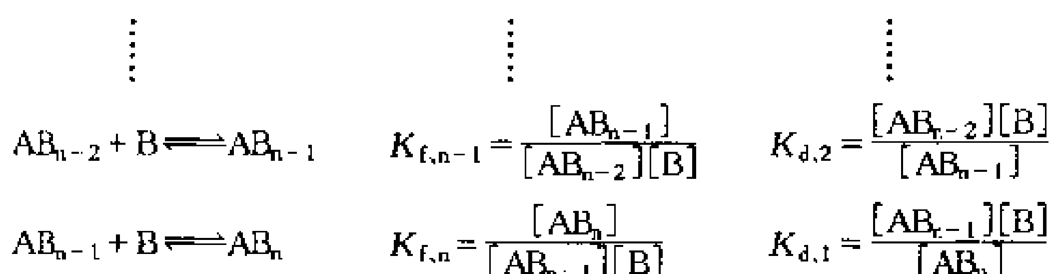
$$\frac{1}{\bar{\nu}}=1+K_d\left(\frac{1}{[B]}\right) \tag{2.2-28}$$

实验测得 $1/\bar{\nu}$ 值对 $1/[B]$ 所作的图是一条直线，其斜率为 K_d，直线截纵坐标于 1 处。

如果 A 的一分子上有几个位点可以结合 B 时，公式即变得很复杂。现将结合反应以相应的结合常数或解离常数写出



反 应	结合常数	解离常数
$A+B\rightleftharpoons AB$	$K_{f,1}=\frac{[AB]}{[A][B]}$	$K_{d,n}=\frac{[A][B]}{[AB]}$
$AB+B\rightleftharpoons AB_2$	$K_{f,2}=\frac{[AB_2]}{[AB][B]}$	$K_{d,n-1}=\frac{[AB][B]}{[AB_2]}$



$$AB_{n-2}+B \rightleftharpoons AB_{n-1} \qquad K_{f,n-1}=\frac{[AB_{n-1}]}{[AB_{n-2}][B]} \qquad K_{d,2}=\frac{[AB_{n-2}][B]}{[AB_{n-1}]}$$

$$AB_{n-1}+B \rightleftharpoons AB_{n} \qquad K_{f,n}=\frac{[AB_{n}]}{[AB_{n-1}][B]} \qquad K_{d,1}=\frac{[AB_{n-1}][B]}{[AB_{n}]}$$

以上这些公式没有写出活度系数并不是热力学平衡常数,它们均是实验常数。每摩尔大分子 A 所结合的 B 的量(n mol)是一个平均量 $\bar{\nu}$,以(2.2-25)式表示,即

$$\bar{\nu}=\frac{[B]_{结合的}}{[A]_{总的}}$$

由于$[B]_{结合的}=[AB]+2[AB_2]+3[AB_3]+\cdots$

$[A]_{总的}=[A]+[AB]+[AB_2]+\cdots$

$[AB]=K_{f1}[A][B],[AB_2]=K_{f1}K_{f2}[A][B]^2,\cdots$

于是可得 $\bar{\nu}$ 的一般表达式为

$$\bar{\nu}=\frac{K_{f1}[B]+2K_{f1}K_{f2}[B]^2+\cdots+n(K_{f1}K_{f2}\cdots K_{fn})[B]^n}{1+K_{f1}[B]+K_{f1}K_{f2}[B]^2+\cdots+(K_{f1}K_{f2}\cdots K_{fn})[B]^n} \tag{2.2-29}$$

已结合的 B 可以促进其它 B 在空结合位上结合,也可能会妨碍其它 B 的结合。若忽略这种影响而考虑到结合位性质的彼此不同,可按(2.2-27)式处理,则分子 A 上总的平均结合数等于每个结合位点上的总和,即

$$\bar{\nu}=\sum_{i=1}^{n}\frac{K_{fi}[B]}{1+K_{fi}[B]} \tag{2.2-30}$$

当所有结合位点上结合 B 的活性相同,即有相同的能量时,所有相加项都相等。于是可以简单地处理,其所有项相加总和为个别项的 n 倍:

$$\bar{\nu}=\frac{nK_f[B]}{1+K_f[B]}=\frac{n[B]}{[B]+K_d} \tag{2.2-31}$$

或

$$\bar{\nu}=n-K_d\left(\frac{\bar{\nu}}{[B]}\right) \tag{2.2-32}$$

按 $\bar{\nu}$ 对 $\bar{\nu}/[B]$ 作图，其直线的斜率为 $-K_d$，$\bar{\nu}/[B]=0$ 在纵坐标上的交点为 n。如果将(2.2-32)式变成倒数公式，即

$$\frac{1}{\bar{\nu}}=\frac{1}{n}+\frac{1}{n}K_d\left(\frac{1}{[B]}\right) \qquad (2.2\text{-}33)$$

则以 $\frac{1}{\bar{\nu}}$ 对 $\frac{1}{[B]}$ 作图，斜率等于 K_d/n。当 $1/[B]$ 接近零时纵坐标上的截距为 $\frac{1}{n}$。

当所有结合位点皆有强烈结合的能力时，即生成结合位点完全被饱和的 AB_n 产物。这种情况在平衡时也能得到比较简单的处理。

$$A+nB \rightleftharpoons AB_n$$

$$\bar{\nu}=\frac{n[AB_n]}{[AB_n]+A}=\frac{nK_f[B]^n}{1+K_f[B]^n} \qquad (2.2\text{-}34)$$

整理后得 $\bar{\nu}/(n-\bar{\nu})=K_f[B]^n$，取其对数为

$$\log\left(\frac{\bar{\nu}}{n-\bar{\nu}}\right)=\log K_f+n\log[B] \qquad (2.2\text{-}35)$$

以 $\log\left(\frac{\bar{\nu}}{n-\bar{\nu}}\right)$ 对 $\log[B]$ 作图仍可得一直线，当 $\log[B]=0$ 时，在其纵坐标上的交点为 $\log K_f$。由直线的斜率可得 n 值。实际上需要采用 Hill 作图法，先猜测 n 值，通过变更 n 值而反复作图不断地校正，直至得到直线图。由于结合现象的复杂性，根据报道所求出的 n 值经常是非整数值而缺乏精确性。例如血红蛋白与氧结合的 n 值等于 2.8。

倘若没有上述的简化条件，也可应用其它方法而计算出所有的平衡常数，这可参见其它参考书。

在讨论蛋白质结合质子的多级平衡中，常惯用解离常数和平均解离常数 $\bar{r}=n-\bar{\nu}$，而

$$\bar{r}=\frac{K_{d_1}/[H^+]+2K_{d_1}K_{d_2}/[H^+]+\cdots+n(K_{d_1}K_{d_2}\cdots K_{d_n})/[H^+]}{1+K_{d_1}/[H^+]+K_{d_1}K_{d_2}/[H^+]^2+\cdots+(K_{d_1}K_{d_2}\cdots K_{d_n})/[H^+]^n} \qquad (2.2\text{-}36)$$

假定具有 j 组性质不同的位置，并忽略它们之间的影响，则

$$\bar{r} = \frac{n_1 K_{d_1}/[H^+]}{1+K_{d_1}/[H^+]} + \frac{n_2 K_{d_2}/[H^+]}{1+K_{d_2}/[H^+]} + \cdots + \frac{n_j K_{d_j}/[H^+]}{1+K_{d_j}/[H^+]}$$

$$(n = n_1 + n_2 + \cdots n_j) \qquad (2.2\text{-}37)$$

2.3 ATP的水解平衡

迄今所发现，在细胞中储能的最重要化合物是三磷酸腺苷(ATP)。在耦合反应中，系统所产生的能量可由生成的ATP贮存，如果需要能量就消耗ATP，人们每天约消耗2公斤多的ATP以满足正常的能量需要。ATP成为系统中能量传递的通用中介物质。

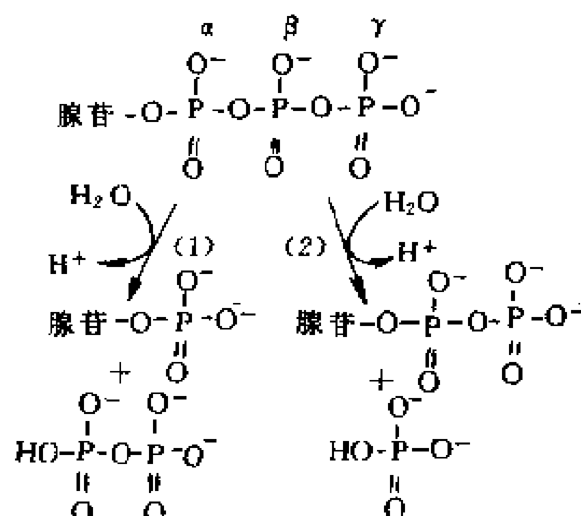


图2-2 ATP水解的两种途径

图中离子基团是在生理pH和生理离子强度下存在的主要形式。ATP分子的磷酸基依次以α、β、γ表示。

三磷酸腺苷能发生两种不同的水解反应(见图2-2)，即(1)α-β间的键被水解断裂而生成AMP和焦磷酸根；(2)β-γ间的键被水解断裂而生成ADP和磷酸根。在pH=7的条件下，两者的水解反应之自由能大致相同。在(1)的水解反应中所产生的焦磷酸还能被水解，造成反应的不可逆性，主要发生在合成核酸的反应中。(2)的水解反应常发生于许多有限度的可逆性过程中，它的产物ADP比AMP易满足能量需要而返回ATP。

许多有机磷酸化合物水解的自由能值列于表2-1。由此可见，α-β间键和β-γ间键水解断裂时可释放相当多的自由能，故常被生物化学家称之为高能键。其它如乙酰辅酶A水解也能释放自由能-31.4千焦。在pH=7的中性条件下，ATP水解成ADP和磷酸根时的主要

表 2-1　一些有机磷酸或重要化合物水解的近似自由能值

化合物例	水解产物或条件	$\Delta G^{\ominus'}$(千焦/摩尔)
ATP^{4-}	$ADP^{3-}+HPO_4^{2-}+H^+$	-34.31^*
	37℃,过量 Mg^{2+},	-30.54
ATP^{4-}	$AMP^{2-}+HP_2O_7^{3-}+H^+$	-35.15^*
	过量 Mg^{2+}	-32.22
ADP^{3-}	$AMP^{2-}+HPO_4^{2-}+H^+$	-35.98^*
AMP^{2-}	腺苷 + HPO_4^{2-}	-9.2
$HP_2O_7^{3-}$	$2HPO_4^{2-}+H^+$	-33.05
	$0.005Mg^{2+}$	-18.83
乙酰磷酸	$CH_3COO^-+HPO_4^{2-}+H^+$	-47.28^*
烯醇式磷酸丙酮酸	$CH_3C(=0)COO^{1-}+HPO_4^{2-}$	-61.50
磷酸肌酸	肌酸$^+$ + HPO_4^{2-}	-42.68
磷酸精氨酸	精氨酸$^+$ + HPO_4^{2-}	-38.07
乙酰辅酶 A		-32.2
葡萄糖-1-磷酸	25℃	-20.92

大部分摘自 Geoffrey Zubay, Biochemistry, 1984. 有 * 的数据与其它书上数据相差较大,例 ATP^{4-} 水解 $\Delta G^{\ominus'}$ 有的采用 −30.5 千焦。上述数据都由千卡乘转换因子 4.184 化得的。

过程为



$$ATP^{4-}+H_2O \rightleftharpoons ADP^{3-}+HPO_4^{2-}+H^+$$

$$\text{平衡常数 } K=\frac{[ADP^{3-}][HPO_4^{2-}][H^+]}{[ATP^{4-}]} \qquad (2.3\text{-}1)$$

生物化学反应通常是在中性或接近中性的条件下进行的,为了省去由$[H^+]=1$ mol/L 至 pH = 7 的校正,就将质子的浓度规定在 10^{-7} mol/L 作为标准态。于是自由能数值和平衡常数都是 pH = 7 时的数据,通常以 $\Delta G^{\ominus'}$、$\Delta G'$ 和 K' 符号表示。上述反应的 $K'=K/[H^+]$,用平衡常数计算自由能时必须分辨清楚。根据表 2-1 中 ATP^{4-} 水解的近似自由能数据,平衡常数 K 值约等于 0.103。对于这种质子得失的水解反应来说,这些量的计算值差异很大。由于

ATP^{4-}、ADP^{3-}和HPO_4^{2-}都不是在 pH=7 条件下唯一存在的形式，它们的磷酸基都是部分质子化的，所以计算 ATP 水解平衡常数变得更为复杂。当计算 pH=7 的平衡常数时，应把 ATP、ADP 和 P(代表磷酸)的浓度都考虑进去，并以 K^* 表示，即

$$K^* = \frac{[ADP,所有存在形式][P,所有存在形式]}{[ATP,所有存在形式]} \tag{2.3-2}$$

设 f_{ATP}、f_{ADP}和 f_P 分别代表 ATP^{4-}对总的 ATP、ADP^{3-}对总的 ADP 和 HPO_4^{2-} 对总的无机磷酸基之比值，于是可得 K 与 K^* 的关系式，藉此可以计算 K^*

$$K^* = \frac{K}{[H^+]}\frac{f_{ATP}}{f_{ADP}f_P} \tag{2.3-3}$$

为了求 f_{ATP}等因子之值，务必了解 ATP 和其它存在形式的电离常数。可以认为$[ATP] \simeq [ATP^{4-}] + [HATP^{3-}] + [H_2ATP^{2-}]$，又设 K_{1ATP}和 K_{2ATP}分别是 $HATP^{3-}$和 H_2ATP^{2-}的电离常数(其值见表 2-2)，便可导得

表 2-2 在 25℃和离子强度 I=0.2 时的解离常数

$HATP^{3-} \rightleftharpoons ATP^{4-} + H^+$	1.12×10^{-7}
$H_2ATP^{2-} \rightleftharpoons HATP^{3-} + H^+$	8.71×10^{-5}
$HADP^{2-} \rightleftharpoons ADP^{3-} + H^+$	1.32×10^{-7}
$H_2ADP^{1-} \rightleftharpoons HADP^{2-} + H^+$	1.18×10^{-4}
$HPO_4^{2-} \rightleftharpoons PO_4^{3-} + H^+$	(10^{-12}数量级)
$H_2PO_4^{1-} \rightleftharpoons HPO_4^{2-} + H^+$	1.66×10^{-7}

$$[ATP] \simeq [ATP^{4-}]\left[1 + \frac{[H^+]}{[K_{1ATP}]} + \frac{[H^+]^2}{[K_{1ATP}][K_{2ATP}]}\right] \tag{2.3-4}$$

对任何给定了 pH 值，f_{ATP}因子即可由上述解离常数和该 pH 值来确定：

$$f_{ATP} = 1/\left[1 + \frac{(H^+)}{(K_{1ATP})} + \frac{(H^+)^2}{[K_{1ATP}][K_{2ATP}]}\right] \tag{2.3-5}$$

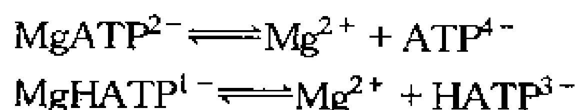
对于 f_{ADP}和 f_P 也可导得同样的表示式。实际上，在 pH=7 时，由 K

和 K^* 之间的差别所引起 ATP 水解自由能的差值仅约 2%，而 pH 值低时差值较大，pH 值高时差值较小。

所有的 ATP 水解反应几乎都在有 Mg^{2+} 或其它两价阳离子(如 Mn^{2+} 等)存在下发生，这些离子与 ATP 和 ADP 均有缔合倾向，则干扰了 ATP 水解反应中所有磷酸基与质子的缔合。对于 Mg^{2+} 的螯合物，用于质子的那些相似项也可以加入到 f_{ATP}、f_{ADP}、f_P 公式的相应项内，以确定 Mg^{2+}(或其它离子)存在下任何 pH 值时的 K^* 值。例如有 Mg^{2+} 存在时以 ATP^{4-} 表示 ATP 总浓度的公式为

$$[ATP]=[ATP^{4-}][1+\frac{(Mg^{2+})}{(K_{MgATP})}+\frac{(H^+)}{(K_{1ATP})}+\frac{(Mg^{2+})}{(K_{MgHATP})}+\frac{(H^+)^2}{(K_{1ATP})(K_{2ATP})}] \qquad (2.3\text{-}6)$$

将它与(2.3-4)公式对比，显然上式多了两个附加项，常数 K_{MgATP} 和 K_{MgHATP} 是 Mg^{2+} 离子分别从 MgATP 和 MgHATP 中解离的平衡常数



$$MgATP^{2-} \rightleftharpoons Mg^{2+} + ATP^{4-}$$

$$MgHATP^{1-} \rightleftharpoons Mg^{2+} + HATP^{3-}$$

镁离子对 ATP 水解自由能的影响又取决于溶液的 pH 值与离子强度，因此是复杂的。在 25℃ 时，离子强度为 0.2，pH＝7 以及无镁离子存在的情况下，由 ATP 水解生成 ADP 的自由能为 －34.31 千焦/摩尔。在镁离子以 0.001 mol/L 浓度存在的情况下，水解自由能即变成 －32.2 千焦/摩尔；当 Mg^{2+} 为 0.01 mol/L 时，其水解自由能为 －31.38 千焦/摩尔。

计算各反应物和产物的浓度对 ATP 水解自由能的影响，可用(2.2-4)式，现将它化为下式：

$$\Delta G^* = -RT\ln K'[10^{-7}] + RT\ln\frac{[ADP^{3-}][HPO_4^{2-}][H^+]}{[ATP^{4-}]} \qquad (2.3\text{-}7)$$

假设所有含磷酸基分子(ATP、ADP 和 P)都以相同浓度存在，并在

pH=7的情况下计算ATP水解自由能,其结果见表2-3。实际上,在大多数细胞中的ATP、ADP和P之浓度,大概都在2至10mmol/L之间,在表中还示出pH6~8范围内水解自由能$\Delta G^{\ominus\prime}$的变化。

表2-3 pH和浓度对ATP水解自由能的影响

pH \ 浓度 \ ΔG	$-\Delta G^{\ominus\prime}$(千焦)	$-\Delta G^{*}$(千焦)		
	1 mol/L	0.1 mol/L	0.01 mol/L	0.001 mol/L
6.0	33.01			
6.2	33.22			
6.4	33.51			
6.6	33.97			
6.8	34.56			
7.0	* 35.15	40.92	46.65	52.38
7.2	35.94			
7.4	36.86			
7.6	37.91			
7.8	38.99			
8.0	40.00			

* 根据R. W. Guynn和R[1]. L. Veech计算,J. Biol. Chem. 248:6966,1973. 折算成千焦。

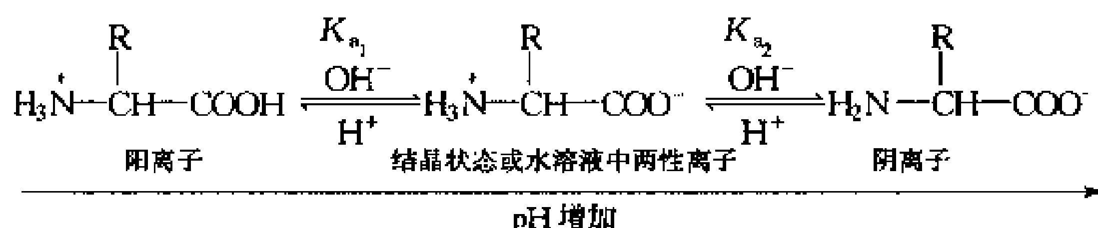
2.4 氨基酸的电离

无可置疑地发现活细胞原生质的pH,实际上恒定地维持在近于7,即具有pH缓冲机制,这就保证了活细胞中的许多重要组分具有一定的分子结构和生物活性。蛋白质应该是原生质组分中最易显示其特性的物质,它具有特定结构和催化功能的活性,并起着对细胞内容物有pH缓冲能力的作用。蛋白质的酸性或碱性性质是由其组成氨基酸类所引起的。氨基酸按结构大致上可分为四类,即中性氨基酸:它带有非解离的、非极性的侧链R,它们是一氨基一羧基的氨基

酸，如甘氨酸、丙氨酸；酸性氨基酸：这类氨基酸侧链 R 中包含另一类羧基，即一氨基二羧基酸，如天冬氨酸、谷氨酸；碱性氨基酸：其侧链 R 中包含另一氨基，是二氨基一羧基酸，如精氨酸、赖氨酸；芳香、杂环氨基酸：其分子中的侧链 R 为芳香基或杂环基，属于前者的如酪氨酸，属于后者的如色氨酸、脯氨酸。按解离性质而言，所有氨基酸都是两性化合物。

2.4.1 两性解离和等电点

在蛋白质水解物中，绝大部分的氨基酸以通用的化学式 $H_2N-\underset{R}{\underset{|}{CH}}-COOH$ 来表示。分子中一方面有氨基而呈弱碱性，能与质子结合而成为带正电荷的—NH_3^+ 离子；另一方面又有羧基可以部分解离出质子而变成—COO^- 负离子，于是呈现弱酸性。两性氨基酸在水中—NH_3^+ 和—COOH 都能解离出质子，其解离度与溶液的 pH 有关，可以用以下式子示出：



水溶液在低 pH 时，氨基酸的存在形式为阳离子，此时仅 α-氨基电离。当逐渐提高溶液的 pH 值(如滴入碱)时，其羧基也开始解离成电离状态，在适当的 pH 值时，生成带正负电荷相当的两性形式，这种形式的氨基酸称为两性离子(或杂化离子)。若 pH 值再提高，占优势的生成物就将是阴离子，最后只有 α-羧基电离。当 pH 等于羧基 pK_a 值(氨基酸的 pK_{a_1})时，由(2.2-17)式可知，阳离子与两性离子即以相等浓度共存。如果 pH 等于—NH_3^+ 基的 pK_a 值(氨基酸的 pK_{a_2})，两性离子就与阴离子以相等浓度共存。调节氨基酸溶液的 pH，使氨基酸分子上的—NH_3^+ 基和—COO^- 基的解离程度完全相等时，氨基酸所有分子带净电荷为零，在电场中的电泳行为犹如不带电

荷分子似的，它既不向阴极移动，也不向阳极移动。此时氨基酸所处溶液的 pH 值称为该氨基酸的等电点，以符号 pI 代替 pH 来表示。

由于在等电点时，氨基酸的溶解度最小，则容易沉淀。利用此性质在生产谷氨酸（味精）时，若将微生物发酵液的 pH 值调到谷氨酸的等电点（pI = 3.22）就会使谷氨酸沉淀析出。现将各种氨基酸的解离常数 pK 和等电点 pI 的近似值列于表 2-4。利用各种氨基酸的等

表 2-4 各种氨基酸在 25℃ 时 pK 和 pI 的近似值

氨基酸名称（代号）	pK_{a_1} (α-COOH)	pK_{a_2}	pK_{a_3}	pI
甘氨酸(Gly,G)	2.34(2.4)	9.60(9.80)		5.97(6.1)
丙氨酸(Ala,A)	2.34(2.4)	9.69(9.7)		6.0
缬氨酸(Val,V)	2.32	9.62		5.96
亮氨酸(Leu,L)	2.36	9.60		5.98
异亮氨酸(Ile,I)	2.36	9.68		6.02
丝氨酸(Ser,S)	2.21	9.15		5.68
苏氨酸(Thr,T)	2.71	9.62		6.18
半胱氨酸(Cys,C) 30℃	1.96	8.18(—SH)	10.28 ($—NH_3^+$)	5.07
胱氨酸(Dcy)30℃	1.00	1.7(—COOH)	7.48 ($—NH_3^+$)，$pKa_4 = 9.02$	(1.7 + 7.48) /2 = 4.60
甲硫氨酸(Met,M)	2.28	9.21		5.74
天冬氨酸(Asp,D)	1.88	3.65(—COOH)	9.60 ($—NH_3^+$)	2.77
谷氨酸(Glu,E)	2.19	4.25	9.67 ($—NH_3^+$)	3.22
天冬酰胺(Asn,N)	2.02	8.80		5.41
谷氨酰胺(Gln,Q)	2.17	9.13		5.65
赖氨酸(Lys,K)	2.18	8.95($α—NH_3^+$)	10.53 ($ε—NH_3^+$)	(8.95 + 10.53) /2 = 9.74

续表

氨基酸名称(代号)	pK_{a_1} (α-COOH)	pK_{a_2}	pK_{a_3}	pI
精氨酸(Arg,R)	2.17	9.04($—NH_3^+$)	12.48(胍基)	(9.04+12.48)/2=10.76
苯丙氨酸(Phe,F)	1.83	9.13		5.48
酪氨酸(Tyr,Y)	2.20	9.11($—NH_3^+$)	10.07 (—OH)	5.66
色氨酸(Trp,W)	2.38	9.39		5.89
组氨酸(His,H)	1.82	6.00(咪唑基)	9.17 ($—NH_3^+$)	(6.00+9.17)/2=7.59
脯氨酸(Pro,P)	1.99	10.60		6.30
羟脯氨酸(HPr)	1.92	9.73		5.83

电点之不同，可以通过电泳法、离子交换法或沉淀法等对混合氨基酸进行分离和制备。pI 的计算式可用以下方法推得：

因 $K_{a_1}=\frac{[\text{两性离子}][H^+]}{[\text{阳离子}]}$ ，$K_{a_2}=\frac{[\text{阴离子}][H^+]}{[\text{两性离子}]}$

且 pH 在等电点时[阳离子]=[阴离子]，只有它们对等才能完全变成两性离子，所以

$$\frac{[\text{两性离子}][H^+]}{K_{a_1}}=\frac{[\text{两性离子}]K_{a_2}}{[H^+]}$$

$$K_{a_1}K_{a_2}=[H^+]^2$$

取对数则 $-\log[H^+]^2=-\log K_{a_1}-\log K_{a_2}$，于是

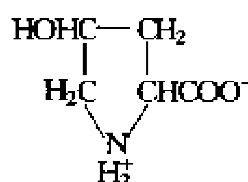
$$\text{pI(即 pH)}=\frac{pK_{a_1}+pK_{a_2}}{2} \tag{2.4-1}$$

pI 值相当于氨基酸两性离子状态时反应式两侧的 pK 之和的 $\frac{1}{2}$ 平均值。各种氨基酸的 pK 与 pI 值和化学式见表 2-4 和表 2-5。

表 2-5　各种氨基酸分子化学式和缩写符号

氨基酸名称	缩写符号(代号)	代 学 式
丝氨酸	Ser(S)	$HOCH_2CH(NH_3^+)COO^-$
苏氨酸	Thr(T)	$CH_3CH(OH)CH(NH_3^+)COO^-$
天冬酰胺	Asn(N)	$H_2NC(=O)CH_2CH(NH_3^+)COO^-$
谷氨酰胺	Gln(Q)	$H_2NC(=O)CH_2CH_2CH(NH_3^+)$-$COO^-$
酪氨酸	Tyr(Y)	HO-⟨苯环⟩-$CH_2CH(NH_3^+)COO^-$
半胱氨酸	Cys(C)	$HSCH_2CH(NH_3^+)COO^-$
天冬氨酸	Asp(D)	$^-OOCCH_2CH(NH_3^+)COO^-$
谷氨酸	Glu(E)	$^-OOCCH_2CH_2CH(NH_3^+)COO^-$
组氨酸	His(H)	H^+ N, N H (咪唞环)—$CH_2CH(NH_3^+)COO^-$
赖氨酸	Lys(K)	$H_3N^+CH_2CH_2CH_2CH_2CH(NH_3^+)$-$COO^-$
精氨酸	Arg(R)	$H_2NC(=N^+H_2)$-$NHCH_2CH_2CH_2CH(NH_3^+)COO^-$
甘氨酸	Gly(G)	$H_2C(NH_3^+)COO^-$
丙氨酸	Ala(A)	$CH_3CH(NH_3^+)COO^-$
缬氨酸	Val(V)	$CH_3CH(CH_3)CH(NH_3^+)COO^-$
亮氨酸	Leu(L)	$CH_3CH(CH_3)CH_2CH(NH_3^+)COO^-$
异亮氨酸	Ile(I)	$CH_3CH_2CH(CH_3)CH(NH_3^+)COO^-$
苯丙氨酸	Phe(F)	⟨苯环⟩-$CH_2CH(NH_3^+)COO^-$
甲硫氨酸(蛋氨酸)	Met(M)	$CH_3SCH_2CH(NH_3^+)COO^-$
脯氨酸	Pro(P)	H_2—H_2, H_2, $HCOO^-$, N H_2^+ (吡咯烷环)
色氨酸	Trp(W)	(吲哚环)—$CH_2CH(NH_3^+)COO^-$, N H

注：① 胱氨酸是由两个半胱氨酸氧化而成的，$HOOCCH(NH_2)CH_2SSCH_2CH(NH_2)COOH$；羟脯氨酸是脯氨酸的吡咯环第 4 位接—OH 基而成，其化学结构式为



② 在蛋白质代谢中还存在另二个氨基酸：
鸟氨酸(Orn)，$H_2NCH_2CH_2CH_2CH(NH_2)COOH$；
瓜氨酸(Cit)$H_2NC(=O)NHCH_2CH_2CH_2CH(NH_2)COOH$。

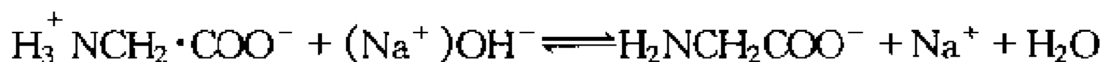
2.4.2 几个氨基酸例

例如：甘氨酸在纯水溶液中是以两性离子形式存在($H_3^+NCH_2COO^-$)，当用盐酸滴定时显示其为弱碱性，即



$$^+H_3N\cdot CH_2COO^- + HCl \rightleftharpoons \overset{+}{H_3}N\cdot CH_2COOH + Cl^-$$

若用氢氧化钠滴定之则示出弱酸性，即



$$\overset{+}{H_3}NCH_2\cdot COO^- + (Na^+)OH^- \rightleftharpoons H_2NCH_2COO^- + Na^+ + H_2O$$

其滴定曲线可见图 2-3。

又如谷氨酸，它在 pH＝3.22 相当酸性的水溶液中才以两性离

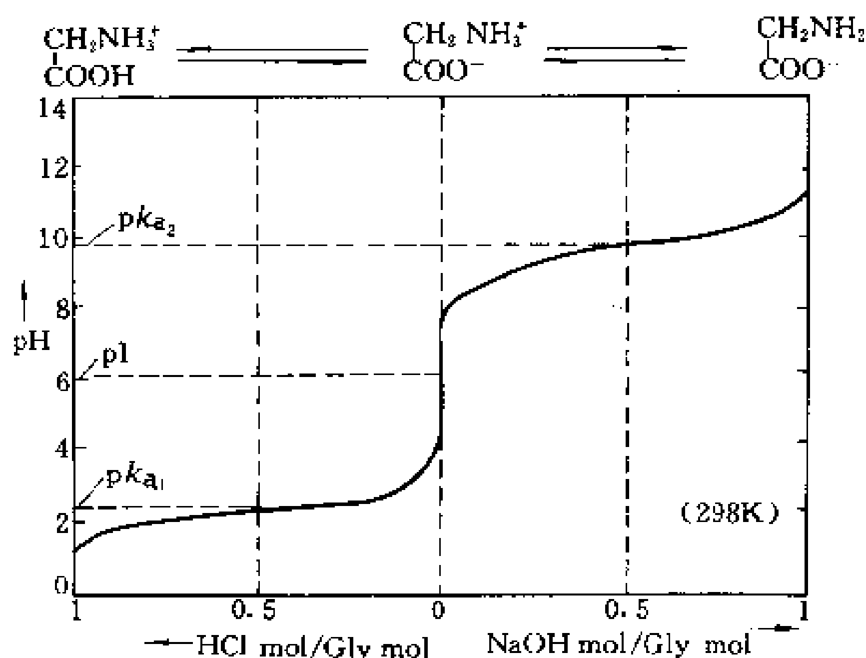


图 2-3　0.1mol dm^{-3}甘氨酸与盐酸和与氢氧化钠的滴定曲线

子存在。从图 2-4 滴定曲线可知，中和谷氨酸时需要相当于其两倍量的碱。在 pH=4.25 处，是谷氨酸之 γ 羧基的表观 pK_{a_2}。当结晶谷氨酸溶于水时，它的两性离子一部分将解离，由 γ 羧基的电离作用，使 pH 下降至 3.22 就达到平衡状态，大部分谷氨酸存在的形式仍是两性离子。倘若谷氨酸溶于 pH=2.2 至 4.0 的缓冲液中，它的两性离子形式依然占优势；溶入 pH=7 的缓冲液中，谷氨酸几乎全部以带负电荷离子 $^-OOC(CH_2)_2CH(NH_3^+)COO^-$ 形式存在。

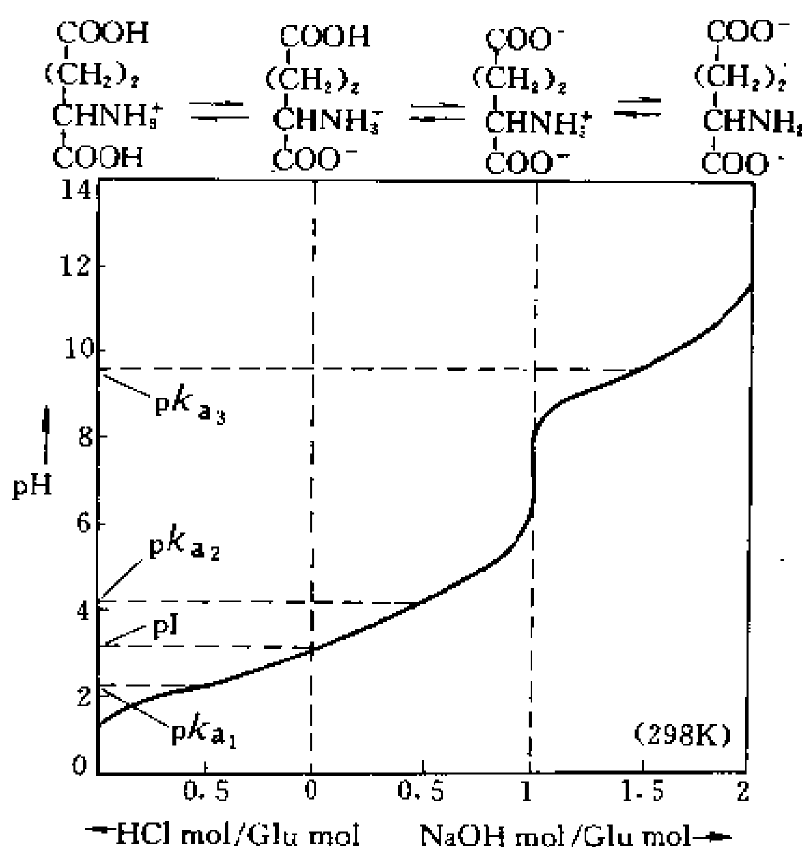


图 2-4　0.1 moldm³ 谷氨酸用盐酸与氢氧化钠的滴定曲线

赖氨酸是二氨基单羧基酸，在纯水中呈碱性溶液，其等电点 pI =9.74。由此等电点开始，中和赖氨酸需要相当于其两倍量的盐酸。在图 2-5 的滴定赖氨酸曲线中，它的表观 pK_{a_2} 值 8.95 和 pK_{a_1} 值 2.18 依次是其 ε-NH_3^+ 和 ε-羧基的特征，而 pK_{a_3} = 10.53 是其 ε-NH_3^+ 的特征。由于两性离子以主要形式存在的 pH 值介于 8.95 与

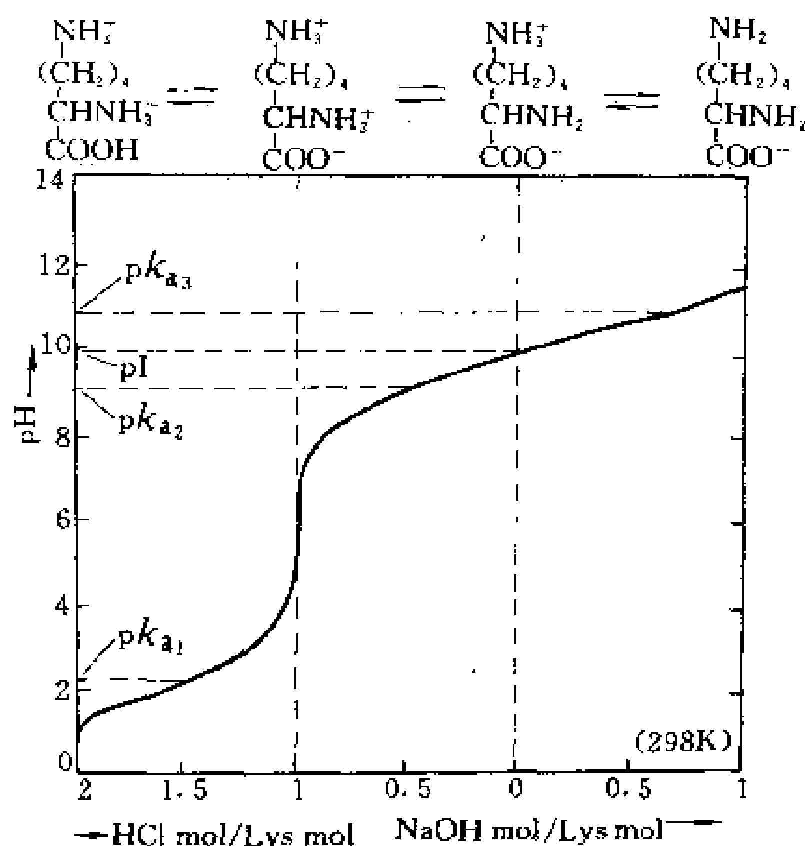
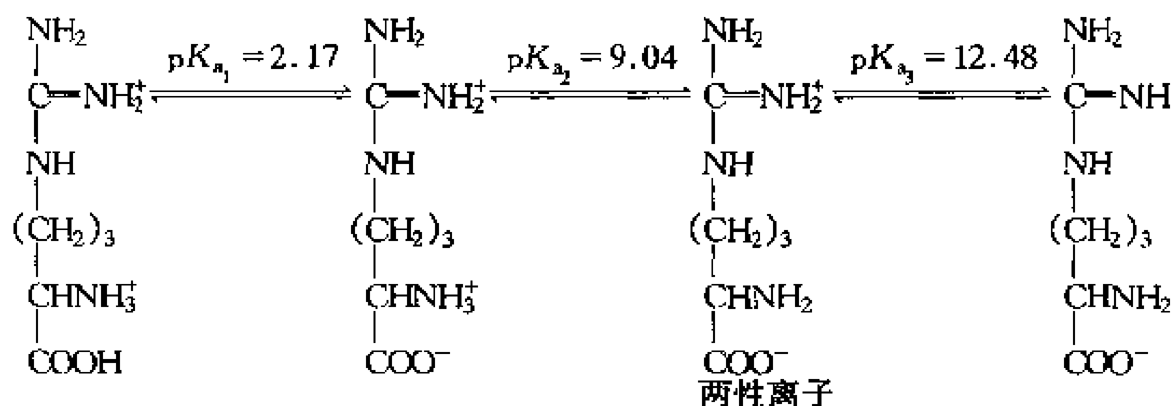


图 2-5 0.1 $moldm^{-3}$赖氨酸用 HCl 和 NaOH 的滴定曲线

10.53 之间，所以 pI 应采用$\frac{pK_{a_2}+pK_{a_3}}{2}$计算，其结果等于 9.74。

当缓冲溶液的 pH 为 7 时，赖氨酸带净正电荷，这是由于$^{+}H_3N$-$(CH_2)_4CH(NH_3^+)COO^-$在溶液中占主要成分之结果。

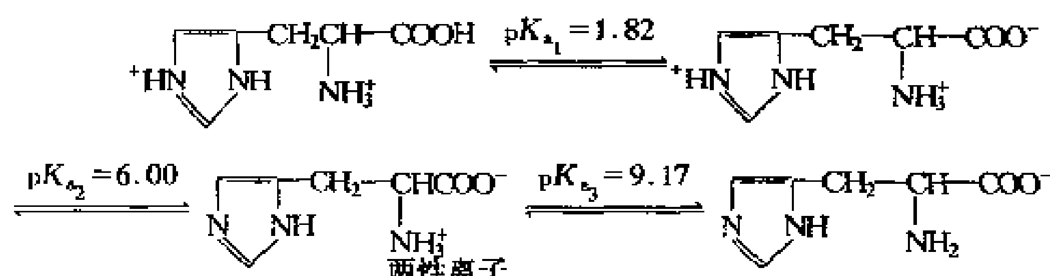
精氨酸含胍基，是属于碱性氨基酸，它的解离式如下：



$$pI=\frac{pK_{a_2}+pK_{a_3}}{2}=\frac{9.04+12.48}{2}=10.76。$$

pH 为 7 时，精氨酸在水溶液中主要呈现阳离子性质。

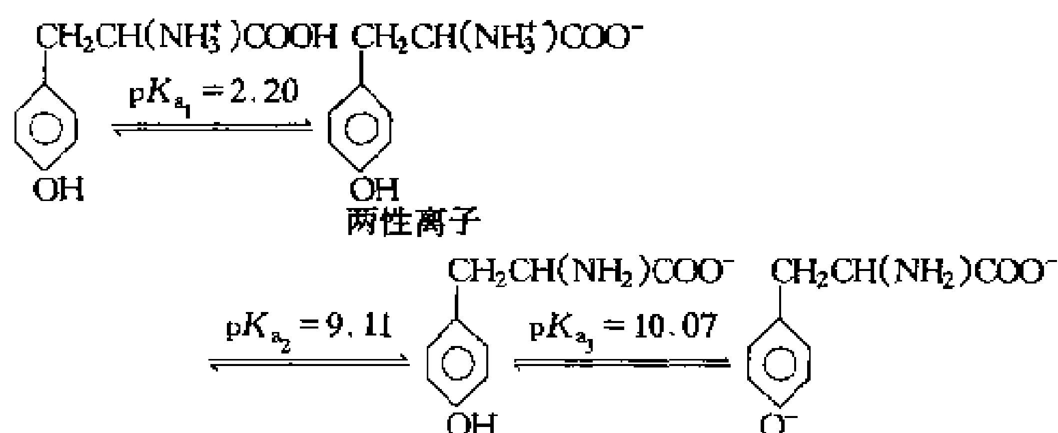
组氨酸含有咪唑环，也属于碱性氨基酸，其解离平衡如下：



$$pI=\frac{pK_{a_2}+pK_{a_3}}{2}=\frac{6.00+9.17}{2}=7.59$$

在一般情况下，水溶液中的氨基酸之解离平衡，总是随着 pH 的增高，先是 α-羧基脱质子，随后其它位上的羧基也脱质子，继而是 α-NH_3^+ 脱质子，接着又是其它位上的氨基脱质子。于是，pI 的计算是以两性离子解离反应两侧的解离常数和其平均值求得。由于组氨酸所含咪唑环上 $^{+}HN\langle$ 比 α 位上的 NH_3^+ 更易解离其质子，因此，它表现出咪唑环先失去正电荷而形成两性离子的特点。

酪氨酸含有苯酚基，它的羟基使酪氨酸呈酸性。其解离平衡为



则 $$pI=\frac{pK_{a_1}+pK_{a_2}}{2}=\frac{2.2+9.11}{2}=5.66$$

2.5 蛋白质等电点的实用性和等离子点

所谓蛋白质的等离子点,实质上是指蛋白质所处溶液中的某一pH值下,蛋白质分子中的酸性基团解离而形成负离子的负电荷,它等于该分子中的碱性基团与质子结合为正离子时所带的正电荷,从而使蛋白质分子内部正负电荷"自行中和"而不携带净电荷。

蛋白质的等电点,即在电泳实验中不向任何一个电极(阴极或阳极)方向移动而显示不带电荷性质的那个溶液之pH值。可见测定蛋白质的电泳移动性质是处于含有小分子阳离子和阴离子的缓冲溶液中,蛋白质大分子与这些缓冲离子有结合的倾向,这可能是由于等电点时分子上原有的电荷中和,在此pH下阴离子被结合的比阳离子多(或阳离子比阴离子多)而引起的,它掩盖了蛋白质分子上原有电荷的未平衡。因此,蛋白质的等电点与等离子点往往与实际情况不一致,其等电点易受测定它的电泳性质时所加入的离子性质和浓度之影响而不恒定。显然,要在实验上测定一种蛋白质的等离子点,该溶液务必在"去离子"水中进行彻底渗析,然后测定不含盐的蛋白质溶液之pH植。不过,溶液中的蛋白质结构总是不均匀的,在等离子点时尚有少许带电荷的结构同时存在。

2.5.1 蛋白质等电点沉淀法

各种蛋白质都是由各种氨基酸以不同组成、比例和顺序组合而成的,它也是两性电解质,其分子中可以解离的基团除了肽链末端的α-氨基和α-羧基之外,主要的还有在肽链氨基酸残基上的侧链基团,例如β-羧基、γ-羧基、ε-氨基、咪唑基、胍基、酚基、巯基等。在低于pI的酸性环境中,各碱性基团与质子结合,致使蛋白质带正电荷;在高于pI的碱性环境中,酸性基团解离出质子,使蛋白质带负电荷。各种蛋白质分别具有特定的等电点,详见表2-6。

表 2-6　几种蛋白质的等电点

蛋白质名称	等　电　点	蛋白质名称	等电点
鱼精蛋白	12.00～12.40	人血清 β-球蛋白	5.12
溶菌酶	11.0～11.2	γ-球蛋白	6.35～7.30
胸腺组蛋白	10.8	γ_1-球蛋白	5.8～6.6
细胞色素 C	9.8～10.3	牛胰岛素	5.30～5.35
血红蛋白	7.07	明胶	4.7～5.0
人血清清蛋白	4.64	鸡蛋清蛋白	4.55～4.90
α_1-球蛋白	5.06	牛胰蛋白酶	5.0～8.0
α_2-球蛋白	5.06	胃蛋白酶	1.0～2.5

胃蛋白酶含酸性残基 37 个，而碱性残基仅有 6 个，其等电点 pI 值远比 7 小，它只等于 1.1。牛胸腺组蛋白分子中含有 11 个赖氨酸、15 个精氨酸和 2 个组氨酸残基，还有 1 个天冬氨酸和 1 个谷氨酸残基，在 pH 为 7 的溶液中，该蛋白质带正电荷，每个分子侧链电离有可能形成带 27 个正电荷和 2 个负电荷，所以它的 pI 高至 10 以上。从雄性鱼类成熟的精子中所提取的鱼精蛋白含精氨酸(碱性)特别多，其等电点高达 12.0。

一般，蛋白质处于等电点的 pH 值时，即最难溶于水而极易沉淀下来，这可能是由于相邻分子最大量的等量相反电荷基团之间的相对吸引，从而使疏水链面向水中所导致的结果。此性能可应用于蛋白质沉淀法纯化，即适当地调节离等电点较远的 pH 值，使与所要沉淀的蛋白质 pI 相同，此时该蛋白质即可沉析而具有不同 pI 的其它蛋白质却不能沉淀。

2.5.2　蛋白质离子交换色层法

蛋白质所携带的电荷随着改变溶液 pH 而变化的性能，已用于离子交换色层法之纯化和鉴定蛋白质。作为蛋白质色层法最好的离子交换物质是弱阳离子和“中间强度”阴离子交换物，例如羧甲基纤维素和乙胺乙基纤维素等，它们原有的电荷是附着在纤维素或葡聚糖的多糖晶格上，相对而言，带一定电荷的蛋白质与这些物质的结合

并不紧，只要采用略有不同 pH 的缓冲溶液，或者逐渐增加离子强度的一定 pH 液，就很容易将其洗脱下来。一般务须在低温(0℃～4℃)下操作，且不使用强酸或强碱缓冲溶液，以避免破坏蛋白质的原结构和生物活性。这种离子交换色层法也可用于分离不同 pI 的氨基酸。

(1) 羧甲基纤维素色层柱

羧甲基纤维素$(C_6H_9O_4 \cdot OCH_2COOH)_n$是弱阳离子交换剂，一般最适合 pI 值大于 7 的蛋白质之色层分析。填充羧甲基纤维素的色层柱，先用较低离子强度而 pH 约为 5 的缓冲液饱和，再将溶于该缓冲液的蛋白质溶液加入色层柱内，处在小于 pI 而带净正电荷的蛋白质即与纤维素原有负电荷基团结合而交换出原有阳离子。然后采取提高 pH 以减少蛋白质的净正电荷之方法，即用递增 pH 的缓冲剂洗脱。另外，逐渐提高离子强度或含有竞争性阳离子的溶液也可将其洗脱。

(2) 乙胺乙基纤维素

乙胺乙基纤维素是中间强度阴离子交换剂，它最适合 pH 值小于 7 的蛋白质色层分析。填充乙胺乙基纤维素的色层柱可先用较低离子强度而 pH 约为 8 的缓冲剂饱和，然后才将溶于同样缓冲剂的蛋白质溶液注入色层柱。处在大于 pI 而带净负电荷的蛋白质，在此 pH 时即与大部分解离而带原有正电荷的乙胺乙基纤维素结合，于是便交换出阴离子。根据随着 pH 下降蛋白质上的净负电荷减少之原理，可以采用递减 pH 的缓冲剂，或者逐步提高离子强度或含有竞争性阴离子的溶液使之洗脱。

2.5.3 蛋白质等电汇聚

蛋白质电泳的有关原理与小分子的电泳分析相同。细心地调节电泳溶液的 pH、离子强度(包括导电率)和温度，就有可能将具有等电点相近和分子大小差异不大的蛋白质分离。利用电泳分离之各种蛋白质所形成"带"的分界具有不同的光折射性，或者各"带"区紫外光吸收本领而给予区别鉴定。电泳也可在固定的介质中进行，对所

分开的“带”区或显色鉴别或将固定介质按“带”区截成几段，然后用缓冲液分别洗脱各段的蛋白质，即可进行分析其含量和生物活性等。

倘若电泳是在固定介质中进行，在此介质上的缓冲溶液可用高分子化合物基质(如淀粉、聚丙烯酰胺凝胶或醋酸纤维等)作支柱，在电场下蛋白质沿着稳定的 pH 梯度移动时会失去它们多余的净电荷，最终在相当于 pI 的 pH 区域因不带净电荷而停止迁移，于是同一 pI 蛋白质即在此区域集中成“带”。用这种方法可将蛋白质混合物的组分分离和鉴定，显然在分析和制备上是一种很有用的技术，尚能测出每种分离出来的蛋白质之 pI 值，称为蛋白质的等电汇聚。

若等电汇聚技术中的固定介质是滤纸，它以缓冲液润湿后安放于电极之间，如图 2-6(a)所示，这只需少量的溶质，不过蒸发和内渗现象可能会造成麻烦。溶液等电汇聚技术装置见图 2-6(b)。

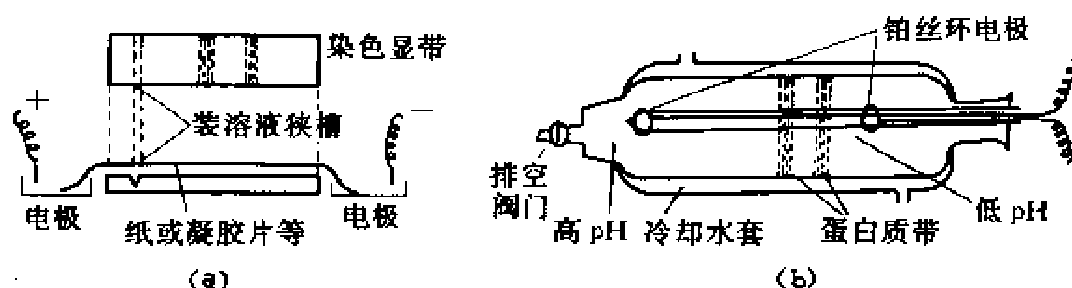


图 2-6 (a)固定介质电泳装置简图；(b)等电汇聚技术简图

如果所用的固定介质是以加入部分水的淀粉塑成之凝胶，则其分辨能力较高，用途也广，但对大分子运动有些妨碍，样品的洗脱较困难。

若以聚丙烯酰胺凝胶作为固定介质，即在小管中使丙烯酰胺聚合和交联而成为凝胶，则分辨力好，易于使用，且内渗现象可略。通常限于小规模试验，因为电阻低，造成通过的电流大。

在实验时需要解决的两个技术关键是：(1)在装置中务必造成所需的密度梯度，以便防止对流之产生，于是一般常采用蔗糖梯度，这是由于蔗糖不带电，与电场互不干扰；(2)必须建立相当稳定的 pH

梯度，能巧妙地产生此 pH 梯度的方法，即在中介区放入低相对分子质量的聚合两性电解质的混合物，每类物质都会移向它的等电区，并停集在那里产生缓冲作用，使这点的 pH 稳定在某特定值，最酸性的聚合两性电解质将汇集在阳极附近，最碱性的在阴极区，这样便建立了稳定的 pH 梯度。在实验中，蛋白质混合物中的任何大分子在电场迁移至对于它是等电点的那个区域，电泳和扩散之间的平衡(不是真正的平衡)将使每种大分子汇集成能稳定相当长时间的"带"区。

2.6　蛋白质对 pH 的缓冲作用

所有蛋白质皆含有许多弱酸和弱碱基团，它们除了各有自己的特殊功能之外，尚具有对组织 pH 的缓冲作用，血红蛋白是其突出的一例。众所周知，人体组织需要 O_2 消耗和 CO_2 释放的呼吸作用，呼吸作用是在肺部由血红蛋白(HHb)与 O_2 结合成氧血红蛋白($HHbO_2$)，并通过动脉血液输送而供应各部位组织，又将人体组织所产生的 CO_2 溶解于静脉血液中而输送至肺部排出，这两者是以循环进行的。该氧血红蛋白在呼吸组织处放出 O_2 而变成血红蛋白；CO_2 因红血球含有的碳酸酐酶催化迅速地与水反应而生成碳酸，碳酸的 $pK_a = 6.1$，当血液的 pH 约为 7.4 时，即有 96% 的碳酸解离为 H^+ 和 HCO_3^- 离子。J.G.Morris 认为，人的肺部每日排出的 CO_2 相当于 1 mol dm^{-3} 的一元酸之 20～40 cm^3。显然，静脉血液一天要运输此量的 CO_2，如果没有血液中的血红蛋白、血浆磷酸盐与血浆蛋白质提供可结合 H^+ 的缓冲作用，且其中的血红蛋白作了四分之三多的贡献，那么静脉血液的 pH 也就不会只比无 CO_2 的动脉血液之 pH 少一点点。

复杂的多解离蛋白质模型以一元弱酸 $HHbO_2$ 和 HHb 来简化地概括，$HHbO_2$ 的 pI = 6.7，HHb 的 pI = 6.81，表明氧血红蛋白的酸性比血红蛋白的强，在血液的 pH 条件下将会有不同程度的解离，即



$$HHbO_2 \rightleftharpoons H^+ + HbO_2^- \qquad pK_a = 6.62$$



$$HHb \rightleftharpoons H^+ + Hb^- \qquad pK_a = 8.18$$

按此计算，在正常血液的 pH 时，有 86% 的氧血红蛋白解离成 HbO_2^-，而血红蛋白却有 85% 是以 HHb 状态存在。这说明氧血红蛋白解脱它的 O_2 变成血红蛋白时，就需要一定量的 H^+ 离子与其结合。呼吸组织从氧血红蛋白吸取氧，生成碱 Hb^- 的同时产生 CO_2，则引起 H^+ 离子的释放，其中大部分的 H^+ 即与 Hb^- 结合。这与单一共轭酸碱偶(一个 pK_a 值)平衡移动缓冲的作用不一样。它是一种被称为等氢交换的现象，此现象主要表现为一种缓冲剂($HbO_2^- - HHbO_2$)变成另一种 pK_a 较大的缓冲剂($Hb^- - HHb$)时吸取了 H^+。

由于 CO_2 在血液中以 HCO_3^- 离子存在的量与 H^+ 是等摩尔的，1 摩尔氧血红蛋白在脱氧的同时，恒定于 pH 为 7.4 的血液所能运走 HCO_3^- 形式的 CO_2，其量即可由 1mol 血红蛋白所结合的 H^+ 离子量与 1mol 氧血红蛋白所结合的 H^+ 离子量之差算得。

根据 $HHbO_2$(酸)$\rightleftharpoons H^+ + HbO_2^-$(共轭碱)，$pK_a = 6.62$ 及(2.2－20)的 $pH = pK_a + \log\left[\frac{共轭碱}{酸}\right]$公式，将血液的 pH＝7.4 和 pK_a 代入而算得 $\log\frac{[HbO_2^-]}{[HHbO_2]} = 0.78$，而$\frac{[HbO_2^-]}{[HHbO_2]} = 6.03$。设 1mol 氧血红蛋白含有 x mol $HHbO_2$，则 HbO_2^- 的含量为$(1-x)$，由此可以求得 $x = 0.142$。在 pH 为 7.4 的血液中，1 mol 氧血红蛋白含有 0.142 mol $HHbO_2$，换言之，1 mol 氧血红蛋白能有效地结合 0.142 mol 的 H^+ 离子而以 $HHbO_2$ 形式存在。

按照 HHb(酸)$\rightleftharpoons H^+ + Hb^-$(共轭碱)，$pK_a = 8.18$ 及 $7.4 = 8.18 + \log\frac{[Hb^-]}{[HHb]}$，算得$\frac{[Hb^-]}{[HHb]} = 0.17$。设 1 mol 血红蛋白含 x mol HHb 和$(1-x)$mol Hb^-，自$\frac{(1-x)}{x} = 0.17$ 解得 $x = 0.850$。1 mol 血红蛋白在 pH 为 7.4 的血液中含有 0.85 mol HHb，即 Hb^- 有效地结合 0.850 mol H^+ 而以 HHb 形式存在。

因此，在 pH＝7.4 的血液中，1 mol 氧血红蛋白释放氧的同时，

可以结合 H^+ 离子之量等于 1 mol 血红蛋白所结合的 H^+ 量减去 1 mol 氧血红蛋白所结合的 H^+ 量，即等于 $0.850-0.142=0.708$ mol。

由此推得，在 pH=7.4 的血液中，随着 1 mol 氧血红蛋白脱氧和结合 H^+ 的结果，可以输送 0.708 mol 碳酸氢基团阴离子而不引起血液 pH 的变化。碳酸氢基团阴离子量就是血液吸收了 0.708 mol CO_2。

还有一部分 CO_2 是以 H_2CO_3 存在形式输送的。在 pH 为 7.4 的血液中，碳酸氢基团阴离子与 H_2CO_3 达到平衡状态时，即 $H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$ 的 $pK_a=6.1$，故按 $7.4=6.1+\log\frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$ 计算，其结果为 $\frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}=20$，也就是说，在 pH=7.4 的血液中含有 0.708 mol HCO_3^-，势必有 0.035 mol H_2CO_3 与它平衡，这 H_2CO_3 之量是因 0.035 mol CO_2 溶解而产生的。

因此，在 pH=7.4 的血液中，自 1 mol 氧血红蛋白脱出 1 mol O_2 的结果，以不改变 pH 值的条件下，可以输送 CO_2 的总量等于 $0.708+0.035=0.743$ mol。

结　束　语

综上所述，生命的整个过程虽是一个不可逆过程，但在生物机体的溶液中存在着许多趋近于平衡的过程，尤其是各类蛋白质溶液的存在，可呈现出缓冲效应的酸碱平衡状态，蛋白质与 O_2、微量元素的络合平衡，以及蛋白质分子的构象间变换平衡和它们的聚集离散平衡，还有水化结构平衡等等。它们在调节生物机体正常的生理运行和新陈代谢中起着极重要的作用。

有关资料报道，酸碱平衡，身体健康。体内酸碱不平衡，百病丛生由此起。例如各种酶的催化运作都在特定的 pH 下进行，若体内的 pH 出现偏差，便会形成各类型过酸或过碱的病症。

每个人体内的平衡运作都有特定的韵律，若韵律紊乱，酸碱便会失去平衡，各种疾病亦随之而起。

倘若体内的 pH 过低，酸性物质过多，即会形成“分解代谢趋势”，其病症包括：风湿性关节炎、低血压、稀便及肚泻、水肿、偏头痛、牙肉收缩及发炎等。

反之，体内的 pH 过高，碱性物质过多，便会形成“合成代谢趋势”，则出现以下病症：高血压、便秘、口疮、糖尿病、骨质疏松症、鼻炎、小便频密、容易伤风感冒及动脉硬化等。

除了以上的病症之外，一部分严重的疾病如癌症等，都可能与体内的酸碱不平衡有关。有些研究证实，一部分癌症如血癌、淋巴腺癌等，是由于人体的碱性过高，酸性物质偏少，形成“合成代谢趋势”所引发的。

由上可知，酸碱平衡等与生命攸关，人们必须重视调节和维护上述的平衡过程。而饮食对体内的酸碱平衡影响颇大，鱼、肉、虾在体内代谢后产生酸性物质，蔬菜、水果在体内代谢之后形成碱性物质，可见不能偏食，这是健康长寿的必要条件。

第三章 酶催化及其反应动力学

3.1 化学动力学的基本知识

生物体内各式各样新陈代谢的生化反应都是在极温和条件(体温37℃,pH接近中性)下进行的,而绝大多数的生化反应均由于酶催化才使反应进行得如此顺利和迅速。酶具有特异的选择性(高度专一性),并对环境极为敏感。在高温或强碱、强酸、重金属等存在下会引起蛋白质变性,从而促使酶丧失活性。但酶也具有催化剂的一般催化动力学特性,因此懂得一定的动力学基本知识,对于了解酶催化作用是有益的。

3.1.1 反应级数及其动力学方程

当物质发生化学反应时,单位时间内生成物形成的量$\frac{d[生成物]}{dt}$或反应物消耗之量$\frac{-d[反应物]}{dt}$常用于表示该反应的速度。气体分子间的反应可用单位时间内它们之分压或浓度的减少或增加量来表达;溶液中则用它们的浓度增减表示。

发生化学反应,首先必须是反应物分子相遇。当反应物浓度增加时,一般会增加其分子碰撞机会,反应速度也会相应地增加。反应速度可以简单地表示为反应物浓度的函数,即

$$v=比例常数\times[反应物]^n$$

式中 v——代表反应速度;

n——代表反应级数。

对于简单反应,n往往是小的整数。n=1时为一级反应;n=2时为二级反应;然n=3的三级反应却是很少见的;n=0为零级反应。例如:

一级：反应速度 $v=-\frac{d[A]}{dt}$ 与一种反应物浓度[A]成比例，即

$$-\frac{d[A]}{dt}=k[A] \tag{3.1-1}$$

二级：反应速度与两种反应物浓度的乘积或与单一反应物浓度的平方成比例，即

$$v=-\frac{d[A]}{dt}=k[A][B] \text{或} v=-\frac{d[A]}{dt}=k[A]^2 \tag{3.1-2}$$

三级：$v=-\frac{d[A]}{dt}=k[A][B][C]$ 或 $v=-\frac{d[A]}{dt}=k[A][B]^2$

$$\text{或 } v=-\frac{d[A]}{dt}=k[A]^3 \tag{3.1-3}$$

零级：$v=-\frac{d[A]}{dt}=k$ (3.1-4)

假定 A→P 是简单的一级反应，起始 A 浓度为 a mol dm^{-3}，经 t 时间之后，a 浓度变为(a-x)mol dm^{-3}，则 P 产物已生成 x mol dm^{-3}。t 时间的反应速度为

$$v=-\frac{d[a-x]}{dt}=\frac{dx}{dt}=k(a-x) \tag{3.1-5}$$

从 t=0，x=0 至 t，(a−x)作定积分得

$$\ln\frac{a}{a-x}=kt \tag{3.1-6}$$

以 $\ln\frac{a}{a-x}$ 值对 t 作图是一直线，其斜率等于 k。k 称作一级反应速度常数，单位为时间$^{-1}$。

类似地也可导出不同级数的反应动力学方程分别为

零级：

$$v=\frac{dx}{dt}=k\ ,\ x=kt \tag{3.1-7}$$

零级反应速度 k 的单位是浓度×时间$^{-1}$。

二级：

$$\text{当 } A+B\rightarrow P \text{ 时，} \frac{dx}{dt}=k(a-x)(b-x) \tag{3.1-8}$$

(i) 若 a=b 则 $\frac{x}{a(a-x)}=kt$ (3.1-9)

(ii) 如果 a>b 则 $\ln\frac{b(a-x)}{a(b-x)}=k(a-b)t$ (3.1-10)

k 是二级反应速度常数，单位是浓度$^{-1}\times$时间$^{-1}$。

假如将不同时间 t 的 a、x 和 t 或 a、b、x 和 t 代人上述方程，用等号左边项的值对 t 作图，以求得代入哪一个方程能呈直线，或测得 k 值单位即可判定该反应的级数。

一种反应物 A 其浓度消耗了一半$\left(\frac{1}{2}a\right)$所需的时间($t_{1/2}$)，通称它为这反应物的"半衰期"。利用半衰期 $t_{1/2}$值与 A 的起始浓度的关系，也可将 a 与 $t_{1/2}$数据代入，藉其符合哪一半衰期方程来判定反应级数。

零级：$t_{1/2}=\frac{a}{2k}$，$t_{1/2}\propto a$ (3.1-11)

一级：$t_{1/2}=\frac{0.693}{k}$，$t_{1/2}$与 a 无关 (3.1-12)

二级：当 a=b 或 $v=k[A]^2$ 时 $t_{1/2}=\frac{1}{ka}$，$t_{1/2}\propto\frac{1}{a}$ (3.1-13)

总而言之，实验观察到的反应速度和反应物浓度之关系，可用速度方程表示，其反应级数就是反应物浓度的总次幂，它是经验数值。简单反应的反应级数可以有 1，2 或零的级数值，但在很多的复杂情况下，n 值可能是分数如$\frac{1}{2}$或 1.6 等。有些复杂反应例如链反应，甚至其反应速度与反应物浓度的关系式中无法表现出反应级数。通过实验测定其反应级数值，可以核实所设想的反应机理(或称历程)是否正确，如果实验测定的级数值与所设想的机理有矛盾，则该机理一定是错误的。

假定一简单反应 A+B→生成物，其速度方程式中对 A 和 B 分别是一级，总的来说是 2 级反应。但是若其中一反应物 B 过量(例如酯在水溶液中水解)或反应中再生(例如 $A+B\xrightarrow{慢}C\xrightarrow{快}B+$生成

物)，此时表观所观察到的是 $v = k_{表观}[A]$，该反应即为表观一级反应 ($k_{表观} = k[B]$)。所以表观的反应级数还随条件而变化。

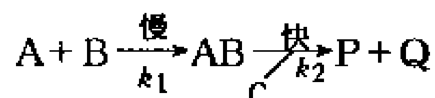
3.1.2 基元反应与反应分子数

反应物分子碰撞时，一步直接转化为生成物分子的反应称为基元反应。在基元反应中，转化为生成物分子所参加反应的反应物分子数称作反应分子数。例如基元反应 $A + B \rightarrow C$，则该基元反应的反应分子数等于 2，称作二分子反应。

绝大多数反应并非基元反应，往往要经过若干个基元反应之步骤方能最后转化为生成物，甚至连简单的化学反应也常要经多步基元反应才完成。例如 $I_2 + H_2 \rightarrow 2HI$ 的反应级数是 2，但它并非 2 分子反应，因为该反应不是基元反应，它是 $I_2 \rightleftharpoons 2I$ 和 $H_2 + 2I \rightarrow 2HI$，即由两步基元反应组成的 2 级反应。

只有基元反应才遵循反应速度与反应物浓度成正比的质量作用定律，也就是说，在速度方程中各浓度的次幂即是各相应物质的系数。从分子参加反应的角度看，各浓度的次幂总和就是反应分子数。例如，此时反应分子数为 2 的基元反应方可称作 2 分子反应，其实验必表现出也是二级反应。三个分子同时碰撞的机会并不多，所以三分子反应的例子很少。

倘若一个反应是经历多步基元反应才完成的，那么，此复杂的反应分子数就无法从该反应式系数得知，不过，每步基元反应分别有各自的反应分子数。例如反应 $A + B + C \xrightarrow[k]{v} P + Q$，实验所得结果是 A 与 B 的反应级数为 2，它也就有可能是



即它是由一速度慢和一速度快的两步基元反应组成的。对于第一步基元反应可按质量作用定律写出二分子反应速度方程

$$\left(\frac{d[AB]}{dt}\right)_1 = k_1[A][B]$$

对于第二步基元反应是 AB 和 C 的二分子反应，

则
$$-\left(\frac{d[AB]}{dt}\right)_2=k_2[AB][C]$$

由于生成 AB 的总速度$\left(\frac{d[AB]}{dt}\right)_{总}$是第一步$\left(\frac{d[AB]}{dt}\right)_1$和第二步$\left(-\frac{d[AB]}{dt}\right)_2$之和，而慢速度的第一步所生成的[AB]会被速度快的第二步消耗掉，即使[AB]浓度处于稳定状态，则$\left(\frac{d[AB]}{dt}\right)_{总}=0$，这种处理方法称作稳态处理。于是

$$k_1[A][B]-k_2[AB][C]=0$$

$$[AB]=\frac{k_1}{k_2}\frac{[A][B]}{[C]}$$

上述总反应的任何一种产物(P 或 Q)之生成速度为

$$\frac{d[P]}{dt}=k_2[AB][C]=k_2\frac{k_1}{k_2}\frac{[A][B]}{[C]}[C]=k_1[A][B] \tag{3.1-14}$$

说明该总反应并非 A 和 B 的二分子反应而只能称作二级反应。由此可见，反应级数和反应分子数以及复杂反应和基元反应的概念是有根本性的区别。

3.1.3 反应的碰撞理论和过渡态理论

实验发现，在反应物浓度维持一定的情况下，反应速度随反应所处的温度之不同而变化，说明反应速度常数是温度的函数，可由 Arrhenius 方程式或其对数形式来表达，即

$$k=Ae^{-E/RT}或 \ln k=\ln A-\frac{E}{RT} \tag{3.1-15}$$

式中 k ——代表速度常数；

T ——代表绝对温度(K)；

R ——代表气体常数；

A ——代表指前因子，也称频率系数；

E ——代表反应活化能。

速度常数的对数在一定温度范围内是绝对温度倒数的直线函数。Arrhenius 定义的活化能为 $E_a = RT^2 \frac{d\ln k}{dT}$，称 Arrhenius 活化能，已发现它与上述公式的活化能是有区别的。关于速度常数随温度改变而变化的理论，现已有由 Arrhenius 和范托夫等提出的碰撞理论和 Eyring 等提出的过渡状态理论。

将 $\ln k$ 对 $\frac{1}{T}$ 作图，可得一直线，其斜率为 $-\frac{E}{R}$，由此可求得活化能 E，自直线在纵坐标上的截距（$\frac{1}{T} \to 0$ 延长线相交处）可求得 A 值。不过，这些都是表观的实验数据。

（一）碰撞理论

物质分子尤其是气体分子各自都具有一定的运动速度，但其运动能量常由于发生分子碰撞而重新分布，只有当两个分子相互碰撞所获得的能量超过某一定量的能量时方能发生反应，而分子要发生反应所必需获得的最低能量称活化能 E。所以，发生反应的分子仅是反应物间碰撞总数 Z 的一小部分。$e^{-E/RT}$ 代表具有超过使反应能进行所需的临界能量那一小部分碰撞数。指前因子应包含碰撞频率 Z 和空间位阻因子 P。于是

$$k = PZe^{-E/RT} \tag{3.1-16}$$

式中 PZ——代表反应物分子在能发生反应的空间一定方位上的碰撞数。

换言之，唯有那些具有比平均能量高出 E 以上的反应物分子在一定方位上的碰撞，才是可引起反应的有效碰撞。

当今，PZ 已经被提出的“有效碰撞截面积”理论所代替。然而，碰撞理论至今尚未能在溶液中预测反应的速度常数，必然会有另外的理论提出。

（二）过渡状态理论

过渡状态理论又称活化络合物理论或绝对反应速度理论。该理论认为反应物分子碰撞后要经过形成一个中间过渡状态——活化络

合物，才会转变为产物。现以简单的例子示意：



$$A+B-C \xrightleftharpoons{\text{可建立平衡}} [A\cdots B\cdots C]^{\neq} \xrightarrow{\text{慢步骤}} A-B+C$$

由此可知，活化络合物中的旧键已松动，新键尚未稳固，使活化络合物具有高能量而处于很不稳定的过渡状态。这活化络合物所具有的高出反应物分子的平均能量，就是形成活化络合物所需要的最少能量，也是反应物生成中间过渡状态活化络合物所需超越的势垒或称所需的活化能，参见图 3-1。

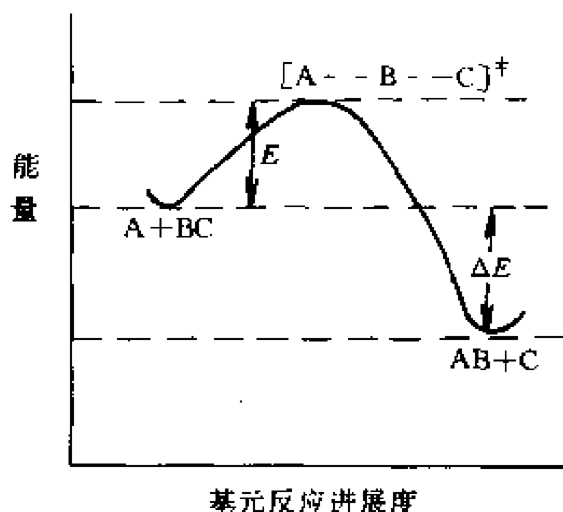


图 3-1　活化络合物的形成过程示意

该例可以导出反应速度方程

$$v=-\frac{d[A]}{dt}=\frac{kT}{h}K_{\neq}[A][BC]=k[A][BC] \qquad (3.1\text{-}17)$$

式中　k——玻兹曼常数（即 $R/\tilde{L}=1.3806\times10^{-23}$ 焦·开$^{-1}$）；

h——普朗克常数（即 $h=0.6626\times10^{-33}$ 焦·秒$^{-1}$）；

$K_{\neq}$——生成活化络合物的平衡常数 $K_{\neq}=\frac{[A\cdots B\cdots C]^{\neq}}{[A][BC]}$；

k——形成生成物 AB 和 C 的反应速度常数。

由于　$$k=\frac{kT}{h}K_{\neq} \qquad (3.1\text{-}18)$$

和　$$\Delta G_{\neq}^{\ominus}=-RT\ln K_{\neq}=\Delta H_{\neq}^{\ominus}-T\Delta S_{\neq}^{\ominus} \qquad (3.1\text{-}19)$$

则　$$k=\frac{RT}{\tilde{L}h}e^{\Delta S_{\neq}^{\ominus}/R}e^{-\Delta H_{\neq}^{\ominus}/RT} \qquad (3.1\text{-}20)$$

对比 Arrhenius 速度常数公式，指前因子 A 受了活化熵的影响，而 E 与活化焓有关。

3.1.4　催化作用

某些物质存在于化学反应系统中，它可改变反应趋向平衡的速

度，但并不改变平衡常数或平衡点，而本身在反应前后没有数量上的变化，同时也没有化学性质的改变，则该物质称催化剂。这种能改变反应速度的作用称催化作用，其加快反应速度的称正催化剂，减慢反应速度的称阻化剂或负催化剂。酶催化都是正催化作用。催化剂的浓度在一定条件下会影响催化反应的速度，但由于它参与反应后再生，浓度维持一定时，就不显现在总反应的化学计量方程式中。

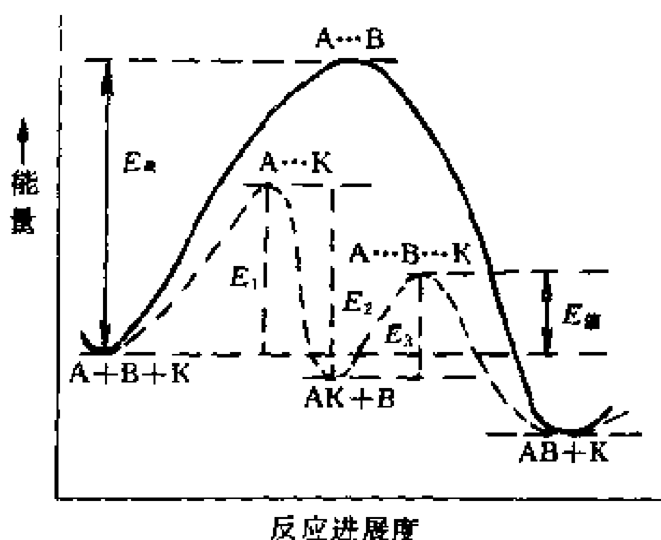


图 3-2　反应途径与活化能

催化剂的加入，能使原非催化反应的速度大大地增加，这主要是由于催化剂参与改变非催化反应的途径，导致所需的活化能较低，尚有可能引起指前因子变大，这些因素均会使速度常数变大，参见图 3-2。设催化剂 K 能加速此反应 A + B→AB，若其机理为



$$A + K \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} AK, AK + B \rightarrow AB + K$$

如果第一个反应很快达到平衡 $C_{AK} = \frac{k_1}{k_2} C_K \times C_A$

第二个反应因 A…B…K 极快分解为生成物 AB 和 K，参见 3.1.2 中的稳态处理，可得

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_3 C_{AK} \times C_B = k_3 \frac{k_1}{k_2} C_K C_B C_A = k_{催} C_A C_B \qquad (3.1\text{-}21)$$

在催化剂存在的情况下，上式的表观速度常数

$$k_{催}=k_3\frac{k_1}{k_2}C_k \tag{3.1-22}$$

上述所有的速度常数都用阿累尼乌斯公式表达，即

$$A_{催}e^{-\frac{E_{催}}{RT}}=\frac{A_1A_3}{A_2}C_Ke^{-\frac{(E_1+E_3-E_2)}{RT}}$$

则

$$E_{催}=E_1+E_3-E_2 \tag{3.1-23}$$

这说明在催化剂的存在下，反应途径（或历程）改变了，无需较高的活化能 E_a，只需超越较小的能峰即可形成产物。

催化剂会对正逆两方向的速度发生同样的影响，所以只能缩短热力学可行的反应达到平衡所需的时间，而不能影响化学平衡，因此也不会改变反应系统的 $\Delta G^{\ominus}$。催化剂的催化作用有特殊的选择性，只要用极少量就可对特定类型的反应进行催化而不作用于另外的反应。

3.2 酶催化反应的动力学

在生物体内进行的各种代谢反应，如蛋白质、糖类、脂肪等的分解和合成基本上都是酶催化反应。所有已知的各种酶本身，也是各自均具有特异选择性并极其有效地催化新陈代谢化学反应的蛋白质。有些酶仅当特殊的小相对分子质量辅因子（称辅酶）存在时，并与之相互作用后方表现出其催化活性。通常将酶催化反应中的反应物称为底物。实验证明，酶催化反应的速度与酶、底物、温度、pH 以及其它干扰物质有关。

3.2.1 酶催化反应的 Michaelis-Menten 方程

L. Michaelis 和 Menten 在实验中发现，酶在固定的低浓度下，反应速度随底物浓度的增加而呈现双曲线之增加，当底物处于高浓度时，反应达到与浓度无关的最大速度（参见图 3-3），显示出酶催化反应的特征。

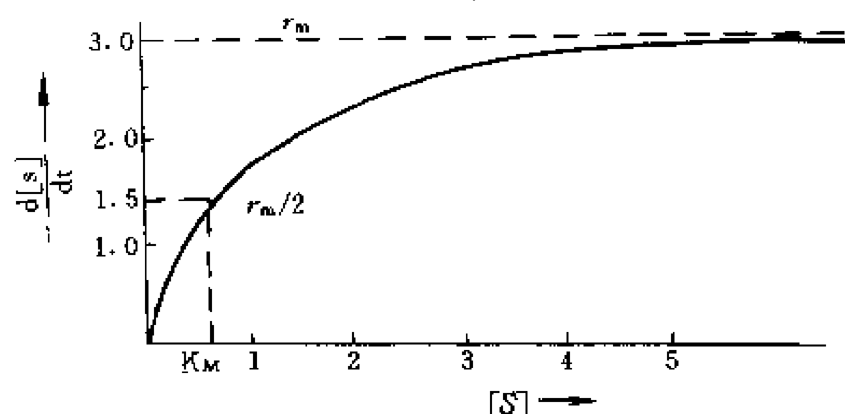
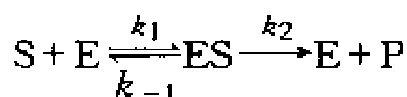


图 3-3　典型的酶催化反应速度曲线

从底物浓度减少$\frac{-d[S]}{dt}$(或以 r 表示)与底物浓度[S]的函数关系示出

酶在固定的低浓度下,将底物浓度适当地增加会使反应速度达到最大值,然而进一步增加底物的浓度却不能引起反应速度继续地增加,说明此时该系统所有酶的位点都占满了结合的底物,这是酶与底物形成中间复合物的强有力证据。从适当底物的浓度,反应速度与底物浓度[S]呈双曲线关系,可以推定酶分子上一个位点所发生的反应与其它位点上的反应无关,即酶的各个催化位点在催化反应中具有同一性。不过,酶催化反应速度对底物浓度的关系不总是严格地遵循双曲线形式,例如天冬氨酸转氨甲酰酶。

根据酶和底物可形成中间复合物而提出了酶催化反应的历程。酶(E)与底物(S)先生成中间复合物(ES),然后(ES)转变成产物(P),并脱出酶(E)。



$$S + E \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

ES 分解为产物 P 是慢速度步骤,它控制着整个反应的速度,而整个的反应速度是与酶-底物复合物的浓度成比例,即

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \tag{3.2-1}$$

式中　k_2——代表每摩尔酶在单位时间内将底物转变成产物的量,摩尔。

Briggs 采用稳态法处理，假定[ES]的分解，使生成[ES]的平衡向右移动，补充了[ES]的消耗，在反应的一定时间内，ES 的浓度保持一定，即$\frac{d[ES]}{dt}=0$。

那么 $$\frac{d[ES]}{dt}=k_1[S][E]-k_1[ES]-k_2[ES]=0$$

$$[ES]=\frac{k_1[E][S]}{k_{-1}+k_2}=\frac{[E][S]}{K_M} \tag{3.2-2}$$

此式也称米氏(Michaelis)方程，式中 $K_M=\frac{k_{-1}+k_2}{k_1}$称米氏常数。由(3.2-2)式可知，$K_M$ 也等于$\frac{[E][S]}{[ES]}$。故米氏常数相当于$[E]+[S]\rightleftharpoons[ES]$络合反应的不稳定常数。它是酶催化反应中代表酶-底物复合物复合强弱的特性参数。各种底物与酶的复合物都具有特定的米氏常数。一些酶的米氏常数见表 3-1。

表 3-1 一些酶的米氏常数(单位用物质的量浓度 C)

酶	底　物	$K_M(c)$
过氧化氢酶	H_2O_2	2.5×10^{-2}
β-半乳糖苷酶	乳糖	4×10^{-3}
麦芽糖酶	麦芽糖	2.1×10^{-1}
谷氨酸脱氢酶	α-酮戊二酸	2×10^{-3}
己糖激酶	葡萄糖	1.5×10^{-4}
	果糖	1.5×10^{-3}
琥珀酸脱氢酶	琥珀酸盐	5×10^{-7}
乳酸脱氢酶	丙酮酸	3.5×10^{-5}
尿素酶	尿素	2.5×10^{-2}
α-淀粉酶	淀粉	6×10^{-4}
蔗糖酶	蔗糖	2.8×10^{-2}

将(3.2-2)式代入(3.2-1)式可得

$$v=\frac{k_2[E][S]}{K_M} \tag{3.2-3}$$

若酶的原始总浓度为$[E_o]$,反应在t时达稳态后,它的一部分变为中间复合物[ES],另一部分仍处于原始游离态[E],$[E]=[E_o]-[ES]$,代入(3.2-2)式而得

$$[ES]=\frac{[E_o][S]}{K_M+[S]} \tag{3.2-4}$$

从(3.2-1)式又可得

$$v=\frac{k_2[E_o][S]}{K_M+[S]} \tag{3.2-5}$$

如以v为纵坐标,[S]为横坐标,按上式作图可得图3.3。

当[S]很小时,$K_M+[S]\approx K_M$,则

$$v=\frac{k_2}{K_M}[E_o][S] \tag{3.2-6}$$

反应对[S]来说是一级反应。这一结论符合实验所得之结果。

当[S]很大而趋于无穷大时,$K_M \ll [S]$,则

$$v_m=k_2[E_o] \tag{3.2-7}$$

即反应速度与酶的浓度成正比,而与S浓度无关,对[S]来说是零级反应,公式亦表示在酶每一固定的总浓度下有一最大的催化反应速度v_m。将(3.2-7)式代入(3.2-5)式,即可整理出各种形式的Michaelis-Menten方程:

$$v=\frac{v_m[S]}{K_M+[S]} \quad 或 \quad v=\frac{v_m}{1+K_M/[S]} \tag{3.2-8a}$$

尚有

$$\frac{v}{v_m}=\frac{[S]}{K_M+[S]} \quad 或 \quad K_M=[S]\left(\frac{v_m}{v}-1\right) \tag{3.2-8b}$$

当$v=\frac{v_m}{2}$时,$K_M=[S]$,换言之,反应速度达到最大速度的一半时,米氏常数就等于底物的浓度。上述方程重新整理后即成为

$$\frac{1}{v}=\frac{K_M}{v_m}\frac{1}{[S]}+\frac{1}{v_m} \tag{3.2-8c}$$

以$\frac{1}{v}$对$\frac{1}{[S]}$作图可得一直线,从直线的斜率可知$\frac{K_M}{v_m}$,从直线的纵坐标上的截距能得$\frac{1}{v_m}$,两者联立求解,可以算出K_M和v_m。直线在横

坐标上的截距是 $-\frac{1}{K_M}$。

米氏常数$\left(K_M=\frac{k_{-1}+k_2}{k_1}\right)$是由三个反应速度常数决定的复杂参数。当 $k_{-1}\gg k_2$ 时，则 $K_M=\frac{k_{-1}}{k_1}$；若 $k_2\gg k_{-1}$，则 $K_M=\frac{k_2}{k_1}$。假如 k_{-1}和 k_2 两者是同一数量级，K_M 仍由三个反应速度常数决定。这三种现象均在不同的酶-底物复合物的实验中发现。

许多的酶催化反应都遵循(3.2-5)式，由此推定的中间复合物是存在的，后以吸收光谱方法也证实一些酶催化反应在反应过程中确有中间复合物形成。

3.2.2 米氏方程的物理意义

综上所述，米氏方程的物理意义可简要地概括为如下几方面：

(一) 该方程提出了酶反应动力学上极为重要的米氏常数 K_M 及其有关的反应速度常数，它们表征了特定的酶催化反应性质、反应条件和酶催化反应速度间的关系。

由于 $K_M=\frac{k_{-1}+k_2}{k_1}$，表达了 K_M 是 k_1、k_{-1}和 k_2 等这些反应速度常数的函数，而这些反应速度常数取决于酶催化的反应性质、反应条件。因此，可以认为 K_M 对于特定的反应和特定的反应条件是一特征常数。

(二) 若以酶与某底物结合的过渡态 ES 中间活化络合物平衡常数 $K_{\neq}$代入，则 $K_M=\frac{k_{-1}}{k_1}+\frac{k_2}{k_1}=K_{\neq}+\frac{k_2}{k_1}$，即 K_M 与活化络合物的络合不稳定常数有关。络合不稳定平衡常数的大小影响着中间活化络合物的稳定性，势必也会直接影响 K_M。

当 $k_{-1}\gg k_2$ 时，可将 K_M 视为活化络合物的 $K_{\neq}$，K_M 越大，活化络合物越不稳定而越易解离，表明酶与底物的亲和力越小；反之，K_M 越小，则酶与底物的亲和力越大。

若 $k_2\gg k_{-1}$，则 $K_M=\frac{k_2}{k_1}$，表达了产物生成和脱离 E 的速度常数

与底物和酶结合成络合物的反应速度常数之比值，K_M 越大，说明比值越大，产物越易被催化而生成。

在大多数情况下，$K_M=K_{\neq}+\frac{k_2}{k_1}$，即酶的催化反应是通过 K_M 综合地表现出 $K_{\neq}$、k_2 和 k_1 的相互影响以及制约之关系。它们的相互作用可表现出诸种酶催化反应的多种多样之性质。

（三）当 $v=\frac{1}{2}v_m$ 时，$K_M=[S]$，即 K_M 有浓度的因次，它也相当于反应达到最大速度一半时的底物浓度，又可视为相当于反应系统有一半酶分子进入催化反应状态所必须具有的底物浓度。由于 K_M 可作为衡量酶催化反应速度与底物浓度之间关系的尺度，所以在实践中人们常利用 K_M 来确定酶催化反应中应该投入的底物浓度。

从(3.2-8a)式可知，如果$[S]\gg K_M$，则 $v\approx v_m$，反应速度接近于最大速度并与底物浓度无关，反应系统呈现零级反应性态；然而，当$[S]\ll K_M$ 时，$v=\frac{v_m}{K_M}\cdot[S]$，反应速度与底物浓度呈线性比例关系而显出一级反应的特征。由此可以认为，底物浓度决定着反应系统的反应级数。

（四）若引入一个表示每个酶分子在单位时间内可使底物转化为产物之最大分子数的动力学常数 $k_{酶催}$，对于简单的反应机制而言，它相当于 k_2；对于较复杂的机制而言，$k_{酶催}$相当于酶催化的酶-底物活化络合物连串变化有关环节各反应速度常数的复合函数。于是和 K_M 一样，对于特定的酶催化反应和特定的反应条件而言，$k_{酶催}$“表观”特征常数表示酶催化的能力，并利用 $v_m=k_{酶催}[E_o]$（即 $k_{酶催}$ 或 v_m）表示在某种酶浓度条件下酶反应可能达到的最大速度。与 K_M 一样，米氏方程就是以 $k_{酶催}$或 v_m 部分地描述酶催化反应性质和反应条件对酶催化反应速度的影响。

（五）对于不同的酶和不同的酶催化反应而言，K_M 的大小可以大不相同，甚至其相差可能达几个数量级，通常均在 $10^{-2}\sim10^{-5}$ mol/L。$k_{酶催}$的差别也相当大，一般的变动范围为 $10^1\sim10^4$/s。关于 K_M 大

小的差异可参见表 3-1，它显示出酶催化反应机制的复杂性。

3.2.3 酶催化反应的一些基本规律

酶是已知的最复杂的催化剂，按照键的重排、断裂和建立都是电子转移反应所引起的观点来归纳，酶的活性基团或者具有亲电子性，即它以缺电子基团攻击多电子基团；或者具有亲核性，它以多电子基团攻击缺电子基团，这均能促使电子迁移而引起底物潜在的反应中心在反应中具有更大的反应活性，也就是加强了底物反应中心亲电子或亲核的趋势。

图 3-4 是以酯的酸或碱催化水解为例。由于氧原子的负电性比碳原子的强，酯分子中羰基（ C═ O）上的氧带部分负电荷 δ^+，而碳上带部分正电荷 δ^+，在酸催化中，酸的亲电子性基团（或质子）攻击而吸引在氧上，导致形成一种碳原子上电荷更正的中间物，使碳更能

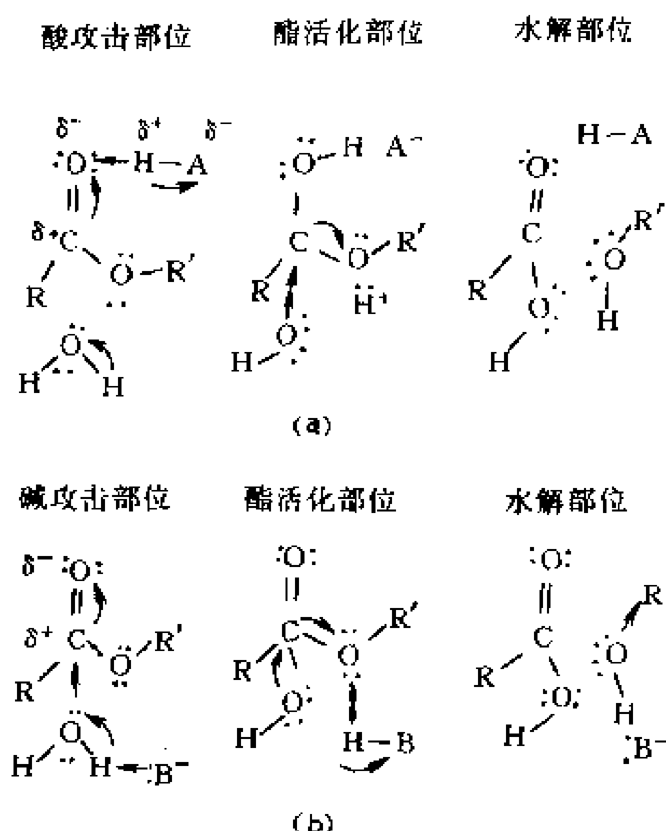


图 3-4 酸(a)或碱(b)催化酯水解的图解

键旁箭头代表电子迁移方向；单箭头为攻击部位；双箭头为活化部位。

吸引另一反应物水的亲核基团而加速其水解。在碱催化酯的水解中，带正电荷的碳原子直接受到碱基多电子基团(或通过多电子的氢氧基上氧)的攻击形成中间物而活化酯的水解基团，导致水解反应加速。

例如蛋白质的—NH_3^+ 或—COOH 基是亲电子基团，在酶中存在的 Mg^{2+}、Mn^{2+} 和 Fe^{3+}等金属离子也是亲电子的。蛋白质的氨基酸侧链中含有一些亲核基团，特别如丝氨酸和酪氨酸的羟基、半胱氨酸的巯基、组氨酸的咪唑基、天冬氨酸和谷氨酸的羧基。亲电子性催化作用中催化剂对底物吸引电子迁移，亲核性催化作用是催化剂供电子导致底物内电子迁移。酶催化反应大致可分为两类：一类仅涉及电子的转移，另一类涉及质子和电子两者或其它基团的转移。酶的催化往往需要辅酶或金属与酶一起发挥协同作用。酶的复杂折叠构造形成活性构象，使活性中心存在 1 个以上的催化集团，所以能协同催化。催化集团存在有 1 个以上与底物结合的位点，使底物按一定的方位结合在活性中心。

3-磷酸甘油醛脱氢酶相对分子质量 14 万，由四个相同亚基(每条多肽链称一个亚基)组成，每个亚基结合一分子烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)能参与催化作用。亚基第 149 位的半胱氨酸残基(组成多肽链的每个不完整分子之氨基酸单位称残基)的巯基(—SH)是活性基团，能特异地选择与 3-磷酸甘油醛结合。能接受反应中脱下氢的 NAD^+ 分子吡啶环与活性—SH 基很近，共同组成催化活性中心，其催化作用机理见图 3-5。

酶蛋白质可分为简单蛋白质和结合蛋白质两大类。脲(水解)酶、胃蛋白(水解)酶和核糖核酸(水解)酶等一般的水解酶都属于简单的蛋白蛋，它们只由各种氨基酸组成而不含其它的成分。转氨酶、碳酸酐酶、乳酸脱氢酸及其它氧化还原酶等均属于结合蛋白质，它是由酶蛋白质与对热稳定的非蛋白质小分子(所谓辅因子或辅酶)小分子结合而成的完整全酶分子，即全酶 = 酶蛋白 + 辅因子。酶蛋白与辅因子单独分离后均无催化活性。只有全酶的协同效应方具有催化

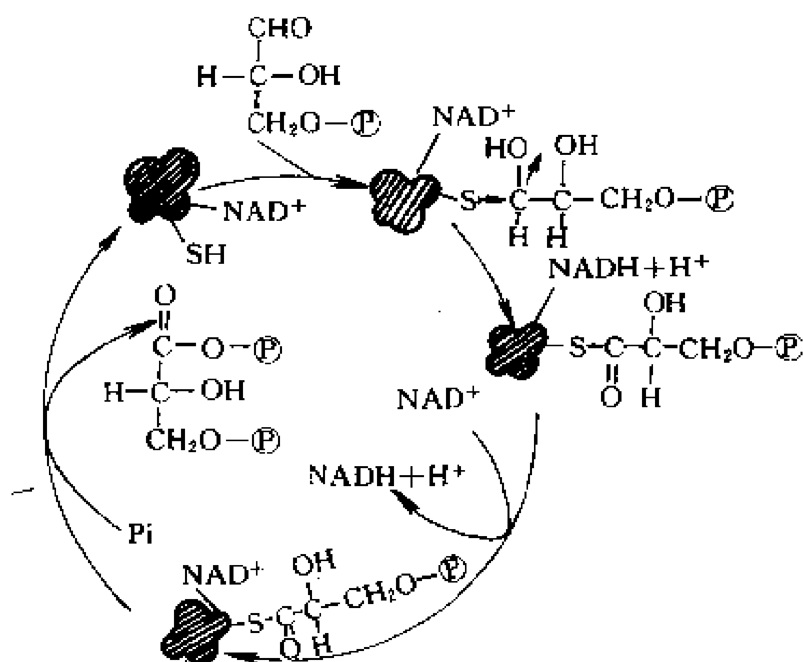


图 3-5 磷酸甘油醛脱氢酶催化机理

活性。酶的辅因子可以是金属离子,也可以是小分子的有机化合物,或两者一起促进酶蛋白活性。通常一种酶蛋白必须与特定的辅酶结合才能成为有催化活性的全酶,否则就不呈现活性。一种辅酶却可与多种不同的酶蛋白结合而组成不同专一性的全酶。例如尼克(或烟)酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)与不同的酶蛋白组成乳酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶或3-磷酸甘油醛脱氢酶。由此可见,酶的选择性催化主体是酶蛋白。

3.3 脂类代谢过程的酶催化

脂类物质是生物体内在化学组成和化学结构上差异相当大的一类有机化合物。但是它们有一共同的物理性质,就是脂溶性,即难溶于水,可溶于非极性有机溶剂(如氯仿、乙醚、丙酮等)中。生物体所含的脂类基本上分为脂肪(中性脂肪)和类脂两类,后者包括磷脂、糖脂、固醇等。这些脂类在生物体内呈现多种生物功能,尤其是作为生

物膜结构的重要组成。

脂肪的生物功能主要是在体内氧化而释放能量，不断地供给机体使用。一克脂肪氧化所释放的能量约38千焦。

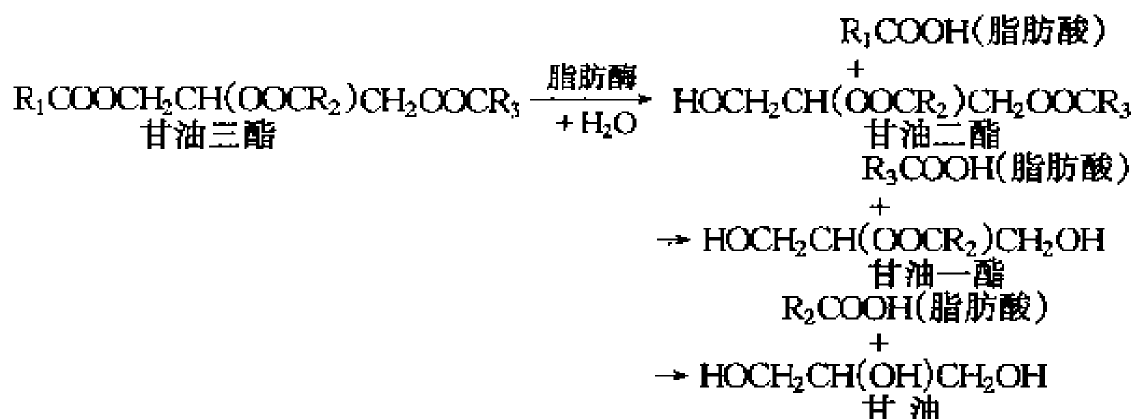
此外，还作为生物体对外界环境的屏障，可以防止机体热量的散失，又是许多组织和器官的保护层。脂肪尚能帮助食物中维生素(A、D、E和K)的吸收。

某些不皂化脂类如类固醇和萜类是具有维生素、激素等生物功能的脂溶性物质。

3.3.1 脂肪的分解代谢

(一) 脂肪水解

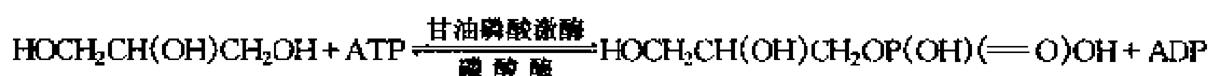
脂肪水解酶可催化脂肪逐步水解产生脂肪酸和甘油，即



然后甘油和脂肪酸在组织细胞内继续逐步地通过各类酶及多种途径被氧化生成 CO_2 和 H_2O。所放出的化学能按步消耗于各机能的生理活动。

(二) 甘油和脂肪酸的氧化

甘油磷酸激酶在ATP的协同作用下，先将甘油转变成α-磷酸甘油，即



在磷酸甘油脱氢酶与辅酶Ⅰ的作用下，α-磷酸甘油变成磷酸二羟丙酮，再经磷酸丙糖异构酶和3-磷酸甘油醛脱氢酶的相继作用即转为丙酮酸，继而在羧酸循环中的各酶催化下逐步代谢。

在五种酶和辅因子的作用下脂肪酸通过五步反应为一轮，每轮都生成一个乙酰辅酶 A 和逐轮减少两个碳原子的脂酰辅酶 A。此酶系的催化反应过程被称为 β-氧化作用。

（1）在硫激酶催化下，脂肪酸先与 ATP 形成脂酰-磷酸腺苷，再由脂酰-磷酸腺苷与辅酶 A 化合，生成了脂酰辅酶 A，于是脂肪酸就被激活，即



$$RCH_2CH_2CH_2COOH + ATP \rightleftharpoons RCH_2CH_2CH_2CO - AMP + PP_i\text{（焦磷酸）}$$



$$RCH_2CH_2CH_2CO - AMP + HSC_oA \rightleftharpoons RCH_2CH_2CH_2COSC_oA + AMP$$

（2）脂酰辅酶 A 脱氢酶的催化反应是在以黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）作氢载体情况下进行的，脂酰辅酶 A 脱去了两个 H 而变成带反式双键的 α，β-烯脂酰辅酶 A，即



$$RCH_2CH_2CH_2COSC_oA + FAD \rightleftharpoons RCH_2CH = CHCOSC_oA + FADH_2$$

（3）水化酶催化 α，β-烯脂酰辅酶 A 转变为 β-羟脂酰辅酶 A：



$$RCH_2CH = CHCOSC_oA + H_2O \rightleftharpoons RCH_2CH(OH)CH_2COSC_oA$$

（4）β-羟脂酰辅酶 A 脱氢酶与辅酶 NAD^+ 的协同作用，促使 β-羟脂酰辅酶 A 脱去两个 H 而变成 β-酮脂酰辅酶 A：



$$RCH_2CH(OH)CH_2COSC_oA + NAD^+ \rightleftharpoons RCH_2COCH_2COSC_oA + NADH + H^+$$

（5）硫酯解酶与另一辅酶 A 协同促使 β-酮脂酰辅酶 A 分解，生成了一分子乙酰辅酶 A 和一分子碳链上少两个碳原子的脂酰辅酶 A：



$$RCH_2C(=O)CH_2COSC_oA + HSC_oA \rightleftharpoons RCH_2COSC_oA + CH_3COSC_oA$$

在上述五种酶与相应的辅酶作用下，可以一轮接一轮地进行分解反应，每轮脂酰辅酶 A 的碳链都要少两个碳原子而使 R 基链长逐步变短。这样的反应重复地进行，终于使一分子脂肪酸变成了许多的乙酰辅酶 A 而参加其它的酶促代谢反应。

激活的长链脂酰辅酶 A 由肉毒碱载体生成了脂酰肉毒碱方能输送而进入线粒体内膜，并在脂酰辅酶 A 肉毒碱转脂酰基酶催化再生成脂酰辅酶 A 和游离的肉毒碱。仅再生的脂酰辅酶 A 才被分布于线粒体内膜和基质中的五种酶逐步催化而进行 β-氧化。

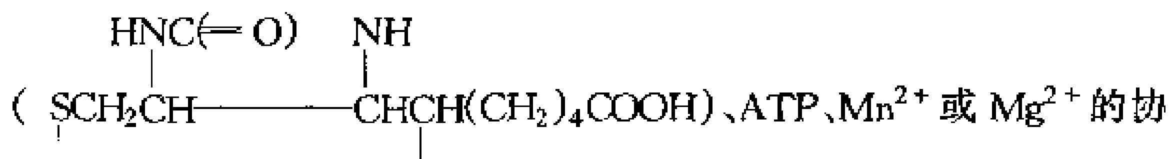
对于软脂肪酸分子完全氧化成乙酰辅酶 A，必须经过 7 轮 β-氧化，生成 7 个 $FADH_2$、7 个还原型 NADH 和 8 个乙酰辅酶 A。7 摩尔 $FADH_2$ 在生物氧化过程中可生成 7×2=14 摩尔 ATP，7 摩尔 NADH，通过呼吸链氧化可生成 7×3=21 摩尔 ATP。8 摩尔乙酰辅酶 A 参加羧酸循环彻底氧化能生成 8×12=96 摩尔 ATP。不过，每摩尔软脂酸甘油酯在生成激活的软脂酰辅酶 A 过程中会消耗 2 摩尔 ATP。因此，1 摩尔软脂酸(256 克)通过生物机体代谢，完全氧化成 CO_2 和 H_2O 时，从理论上可净合成 129 摩尔 ATP。量热计测定 1 摩尔软脂酸完全燃烧成 CO_2 和 H_2O 可放热 9790.56 千焦。由此可见，软脂酸氧化所产生的能量约有(30.5×129÷9790.56)×100%≈40%以磷酸键形式贮存起来。

3.3.2 脂肪的合成代谢酶系

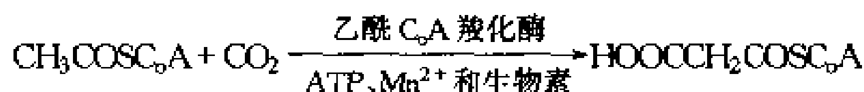
(一) 脂肪酸的生物合成

动物和微生物的脂肪酸合成酶系，以多酶复合体系形式存在于细胞质中，细胞质处是脂肪酸合成的主要场所。植物则在细胞质、线粒体或叶绿体中合成脂肪酸。

在乙酰辅酶 A 羧化酶以及多种羧化酶的辅酶生物素

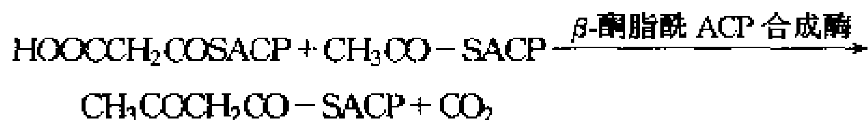


同催化下，乙酰辅酶 A 可与 CO_2 合成丙二酰辅酶 A，即



$$CH_3COSC_oA + CO_2 \xrightarrow[\text{ATP、}Mn^{2+}\text{和生物素}]{\text{乙酰 }C_oA\text{ 羧化酶}} HOOCCH_2COSC_oA$$

并在转酰酶作用下，将丙二酰基和乙酰基都从辅酶 A 转移到酰基载体蛋白质(ACP，大肠杆菌的 ACP 是由 77 个氨基酸构成的蛋白质)上，且输送至线粒体外细胞质处，然后 C_3 片段的丙二酰基与 C_2 片段的乙酰基缩合脱羧生成乙酰乙酰基(C_4 片段)。



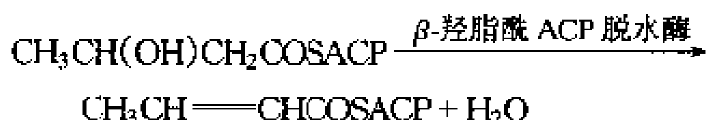
$$HOOCCH_2COSACP + CH_3CO-SACP \xrightarrow{\beta\text{-酮脂酰 ACP 合成酶}} CH_3COCH_2CO-SACP + CO_2$$

又在以 NAD 磷酸还原型(NADPH)为辅酶的 β-酮脂酰 ACP 还原酶作用下，将乙酰乙酰基-ACP 还原成β-羟丁酰 ACP。



$$CH_3COCH_2CO-SACP+NADPH+H^+ \xrightarrow{\beta\text{-酮脂酰 ACP 还原酶}} CH_3CH(OH)CH_2COSACP+NADP^+$$

随后在 β-羟脂酰 ACP 脱水酶作用下脱水生成 β-烯丁酰-ACP。



$$CH_3CH(OH)CH_2COSACP \xrightarrow{\beta\text{-羟脂酰 ACP 脱水酶}} CH_3CH=CHCOSACP+H_2O$$

继而在 β-烯脂酰 ACP 还原酶和 NADPH 协同作用下将 β-烯丁酰 ACP 变成丁酰 ACP。



$$CH_3CH=CHCOSACP+NADPH+H^+ \xrightarrow{\beta\text{-烯脂酰 ACP 还原酶}} CH_3CH_2CH_2COSACP+NADP^+$$

以上几个步骤组成了第一轮的脂肪酸合成，产物是丁酰 ACP，比原来的乙酰基增加了两个碳原子，按此过程一轮一轮地增长，可得到软脂酸。

线粒体处生成的乙酰辅酶 A 与草酰乙酸生成柠檬酸后被输送到线粒体外，于是在细胞质的柠檬酸裂解酶催化下再转变为乙酰辅酶 A。



柠檬酸 + ATP + HSC_oA→乙酰辅酶 A + ADP + P_i + 草酰乙酸

其次，在线粒体中可进行与脂肪酸 β-氧化相似步骤的逆向过程，使一些 C_{16}脂肪酸碳链逐轮增长至 C_{24}。在此过程中首先由缩合酶催化脂酰辅酶 A 与乙酰辅酶 A 缩合形成 β-酮脂酰辅酶 A，再经还原型辅酶Ⅰ(NADH)和还原型辅酶Ⅱ(NADPH)供氢还原成比原来多 2 个碳原子的脂酰辅酶 A。如果在线粒体中利用丙二酰辅酶 A 加长碳链，在还原过程中由 NADPH 供氢，即勿需脂酰载体蛋白。

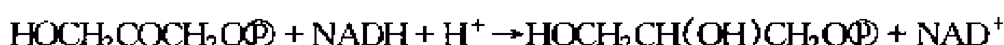
(二) 脂肪的合成

经特异的甘油激酶作用甘油与 ATP 反应可得 α-磷酸甘油酯：

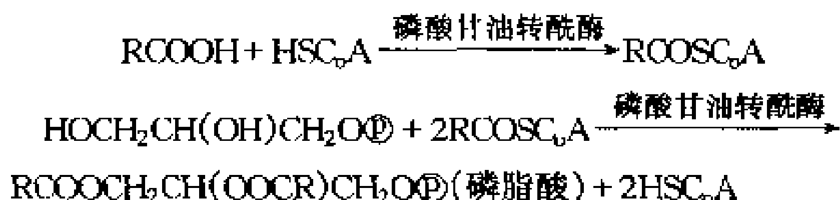


$$HOCH_2CH(OH)CH_2OH+ATP \xrightarrow{\text{甘油激酶}} HOCH_2CH(OH)CH_2O\text{Ⓟ}+ADP$$

α-磷酸甘油酯也可在辅酶Ⅰ参与下由磷酸二羟丙酮还原产生，即



脂肪酸硫激酶可催化脂肪酸与辅酶 A 而生成脂酰辅酶 A。尔后，脂酰辅酶 A 和 α-磷酸甘油酯再由磷酸甘油转酰酶进行酶促缩合而生成磷脂酸：

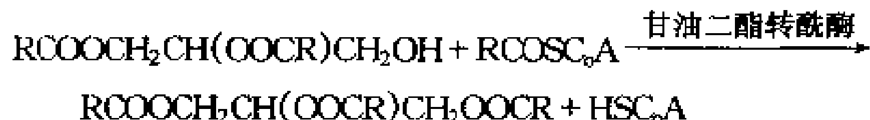


磷酸甘油转酰酶仅作用于 α-磷酸甘油酯，并对 C_{16} 和 C_{18} 的脂酰辅酶 A 与其反应的催化作用最强，所以动物体内由软脂酸及硬脂酸所组成的脂肪分子较多。

磷脂酸磷酸酶作用于磷脂酸可生成甘油二酯及磷酸(P_i)，即

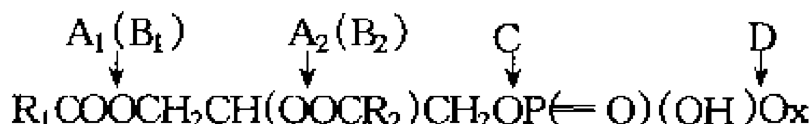


由甘油二酯转酰酶促进甘油二脂与另一分子的脂酰辅酶 A 缩合而生成甘油三酯：



3.3.3 类脂物磷脂的代谢

构成生物膜的主要成分磷脂是磷脂酸的衍生物[$R_1COOCH_2CH(OOCR_2)CH_2OP(=O)(OH)(Ox)$]。其中的 R_1、R_2 为 C_{14}～C_{20} 羧酸的烃基(通常是油酸或软脂酸)；—Ox 是乙醇胺($—OCH_2CH_2NH_2$)或胆碱[$—OCH_2CH_2N^+(CH_3)_3$]之类取代物。现已发现生物体内存在着各种磷脂(水解)酶，主要的有磷脂酶 A_1 和 A_2、磷脂酶 B_1 和 B_2、磷脂酶 C 和磷脂酶 D 等，它们各自具有对磷脂分子的不同部位进行水解的选择性。以↓表示水解部位如下：

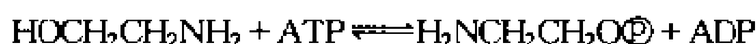


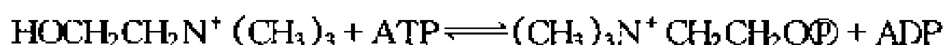
水解所生成的各种组分又经历各种酶促途径而进行分解代谢或在代

谢中起参与作用。例如甘油转为糖代谢，脂肪酸经 β-氧化而分解等。

同位素 P^{32}作动物实验，证明哺乳动物的所有组织均可以不同速度合成磷脂。磷脂酰乙醇胺和磷脂酰胆碱的合成途径如下：

在磷酸激酶的作用下，由水解酶催化所得的醇胺或胆碱与 ATP 反应生成磷酸乙醇胺或磷酸胆碱。





在转胞苷酶作用下，磷酸乙醇胺或磷酸胆碱又和胞苷三磷酸(CTP)反应，生成中间产物胞二磷乙醇胺或胞二磷胆碱。然后再与甘油二酯作用生成磷脂酰乙醇胺或磷脂酰胆碱。继而再与甘油二酯作用生成磷脂酰乙醇胺或磷脂酰胆碱。

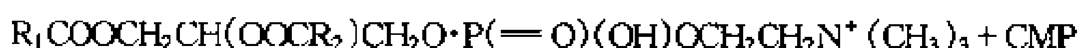












植物及微生物体内的磷脂合成途径与此略有不同。

另一类脂物胆固醇脂的代谢，可在胆固醇酯酶催化下水解而生成胆固醇和脂肪酸。胆固醇又能转化为孕酮、肾上腺皮质激素、维生素 D_3 或胆酸等等。此外，机体的各种组织都能以不同速度合成胆固醇。

3.4 蛋白质的酶促降解与氨基酸代谢

在生物体的新陈代谢中，蛋白质不断协调地进行分解代谢和合成代谢，这具有十分重要的生理意义。蛋白质在生物体内由蛋白水解酶参与下，加水分解成氨基酸后才继续进行分解代谢，或者提供合

成自身所需的蛋白质。

3.4.1 蛋白质的酶促降解

蛋白水解酶催化蛋白质的肽键，从而使其加速断裂，最后生成氨基酸。于是它可分为肽链内切酶、肽链外切酶和二肽酶三类。肽链内切酶能水解切断肽链内部的肽键，如胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶。肽链外切酶仅水解肽链两端氨基酸所形成的肽键，如羧肽酶、氨肽酶。二肽酶只水解二肽。蛋白质在动物消化道中，要通过一系列酶的联合作用方被水解成为各种不同的氨基酸。

各种蛋白水解酶对不同氨基酸所形成的肽键尚具有选择性催化作用。例如胃蛋白酶可催促迅速水解芳香族氨基酸（如苯丙氨酸、酪氨酸等）的氨基和其它氨基酸形成的肽键，也能比较缓慢地使其它一些氨基酸（如亮氨酸和酸性氨基酸）参与形成的肽键水解。胰蛋白酶可水解碱性氨基酸（如赖氨酸或精氨酸）的羧基所形成的肽键。肽键内切酶水解蛋白质会产生小肽。

胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶在245个氨基酸位置上均有His 57、Asp 102和Ser 195是与催化机制有关的主要基团。它们在分子链于三维空间内折叠中，通过链的回转，3个（57、102和195）有催化作用的侧链在分子表面的凹陷处被带到一起，组成酶的活性部位，在消化作用中被水解之底物有关欲切断的NH-CO键前方侧链基团会结合在此凹陷处（称袋穴）就位而活化。组氨酸的氮把丝氨酸的质子拉向自已，并转给即将被水解的底物肽键氮原子上的孤对电子。天冬氨酸的重要性在于，它的基团通过与咪唑环上的另一质子形成静电键，而有助于组氨酸对丝氨酸上那个质子的吸引。在底物多肽的N上接受组氨酸转来的质子时，N—C键被削弱至最后断裂。半条多肽链以游离胺RNH_2形式离去，另外半条链在酶上受水分子攻击酰基的羰基碳原子形成—COOH而脱出，酶的活性部位复原。

应用模型酯化物为底物作实验，其速度与水解肽键相当，测得的催化速度常数$k_{催}$（参见3.2-7式$k_{催}=v_m/[E_o]$，式中的$[E_o]$为活性部位的摩尔浓度）列于表3-2。

表 3-2　胰凝乳蛋白酶水解各种酯的速度

底　　物	$k_{催}$(s^{-1})
乙酰苯丙氨酸甲酯	
L型	63
D型	很小
甲酰苯丙氨酸甲酯	
L型	很大
D型	0.0034
苄基丙氨酸甲酯	
L型	0.26
D型	0.011
3-甲氧甲酰-3,4-二氢异喹诺酮	
L型	0.12
D型	22.7

摘自 Geoffrey Zubay, Biochemistry, 1984

胰凝乳蛋白酶对于乙酰苯丙氨酸甲酯的水解可写成



$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \qquad K_S = \frac{k_{-1}}{k_1} \tag{3.4-1}$$



$$ES \xrightarrow{k_2} P_1 + EP_2 \quad \text{（肽是乙酰化为限速步骤）} \tag{3.4-2}$$



$$EP_2 \xrightarrow{k_3} E + P_2 \quad \text{（酯是脱酰基为限速步骤）} \tag{3.4-3}$$

式中　ES——代表酶-底物复合物；

K_s ——代表酶-底物复合物的解离常数；

S ——代表乙酰苯丙氨酸甲酯的浓度；

P_1 ——代表甲醇；

P_2 ——代表乙酰苯丙氨酸。

可以导得稳态动力学速度常数为

$$k_{催} = \frac{v_m}{[E_o]} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} \tag{3.4-4}$$

表观米氏常数 $K_{M(表观)} = K_s\left(\frac{k_3}{k_2 + k_3}\right)$ (3.4-5)

在酯水解中乙酰化的速度常数 k_2 远大于脱酰基速度常数 k_3，则

$$k_{催} = k_3 \tag{3.4-6}$$

$$k_{M(表观)} = K_s(k_3/k_2) \tag{3.4-7}$$

在酰胺或肽水解时，乙酰化 k_2 比脱酰化 k_3 小得多，于是

$$k_{催} = k_2 \tag{3.4-8}$$

$$k_{M(表观)} = K_s \tag{3.4-9}$$

从以上公式可见，酯水解的 $K_{M(表观)}$ 实际上比可逆解离常数 K_s 小得多，这是由于 ES 有部分以共价键结合。酰胺水解时，ES 大部分是以可逆方式结合的，因而 $K_{M(表观)}$ 基本上等于 K_s。

肽链外切酶的羧肽酶和氨肽酶可分别作用于蛋白质多肽链的游离羧基端和游离氨基端，逐一地将肽链水解成氨基酸。所以蛋白质经肽链外切酶作用能产生许多氨基酸，最后还剩下二肽。

二肽酶专一水解二肽而产生氨基酸。

动物各器官组织、植物体、甚至微生物均含有各类蛋白酶，在一定条件下催化蛋白质水解成氨基酸。

3.4.2 氨基酸的分解代谢

天然氨基酸分子都含有 α-氨基和羧基，因此各种氨基酸均有共同的代谢途径，大概有脱氨基和脱羧基两方面的酶催化作用。

（一）脱氨基作用

1. 氧化脱氨基

催化氨基酸氧化脱氨基作用的酶有 L-氨基酸氧化酶、D-氨基酸

氧化酶和 L-谷氨酸脱氢酶等。反应分二步进行：



$$RCH(NH_2)COOH \xrightarrow[-2H]{\text{酶}} \underset{\alpha\text{-亚氨基酸}}{RC(=NH)COOH} \xrightarrow{+H_2O} \underset{\alpha\text{-酮酸}}{RC(=O)COOH} + NH_3$$

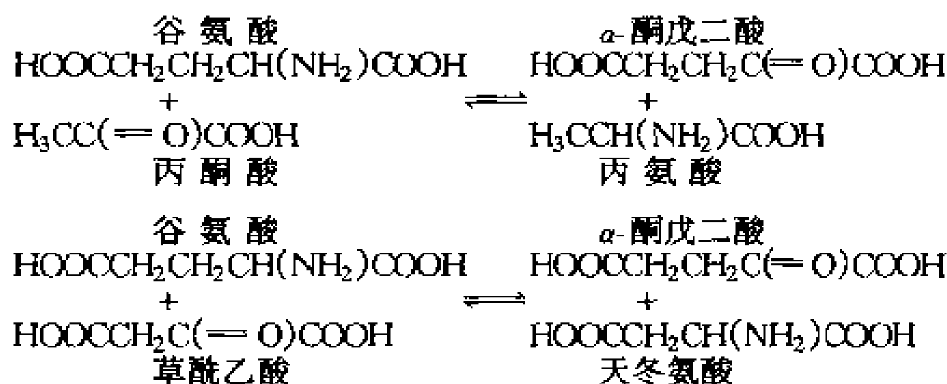
L-氨基酸氧化酶催化 L-氨基酸氧化脱氨；D-氨基酸氧化酶催化 D-氨基酸氧化脱氨。它们皆是以 FAD 为辅因子的黄素蛋白，它们催化氨基酸脱下的氢由 FAD 带交到氧分子上而形成过氧化氢，再由过氧化氢酶分解为水和氧。但两者在体内或因酶分布不普遍，在生理条件下活性低或体内 D-氨基酸的含量不高，因而不起重要作用。

L-谷氨酸脱氢酶以 NAD^+ 或 $NADP^-$ 为辅酶，能以较强的活性催化 L-谷氨酸氧化脱氨基，生成 α-酮戊二酸及氨。此酶还可逆向催化合成 L-谷氨酸。

2．转氨基作用

转氨酶以磷酸吡哆醛或磷酸吡哆胺为辅酶，可以催化 α-氨基酸的氨基转移到α-酮酸上，从而生成相应的另一分子 α-酮酸和另一分子α-氨基酸。

转氨酶的种类颇多，分布也广，它作用在生物体内极为普遍，除了赖氨酸、苏氨酸之外，其余的 α-氨基酸都可参加转氨基反应，不过各自均有其专一的转氨酶。例如谷丙转氨酶能催化谷氨酸与丙酮酸之间的转氨基作用；谷草转氨酶可催化谷氨酸与草酰乙酸之间的转氨基作用。



$$\underset{\text{谷氨酸}}{HOOCCH_2CH_2CH(NH_2)COOH} + \underset{\text{丙酮酸}}{H_3CC(=O)COOH} \rightleftharpoons \underset{\alpha\text{-酮戊二酸}}{HOOCCH_2CH_2C(=O)COOH} + \underset{\text{丙氨酸}}{H_3CCH(NH_2)COOH}$$

$$\underset{\text{谷氨酸}}{HOOCCH_2CH_2CH(NH_2)COOH} + \underset{\text{草酰乙酸}}{HOOCCH_2C(=O)COOH} \rightleftharpoons \underset{\alpha\text{-酮戊二酸}}{HOOCCH_2CH_2C(=O)COOH} + \underset{\text{天冬氨酸}}{HOOCCH_2CH(NH_2)COOH}$$

这两种转氨酶在不同动物组织中的活性各异，谷草转氨酶(GOT)以在心脏中的活性最强，肝脏中其次；谷丙转氨酶(GPT)以在肝脏中的

活性最大，若肝细胞有所损伤，酶就会潜入血液，临床测定血液中其含量正常还是增高，即可推定人们的肝功能正常与否。

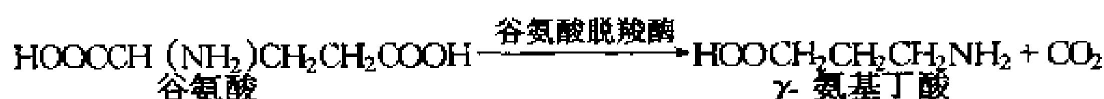
转氨酶的辅酶都是磷酸吡哆醛。它能接受氨基酸的氨基而变成磷酸吡哆胺，继而将其氨基转交另一 α-酮酸。

3．转氨后脱氨的联合作用

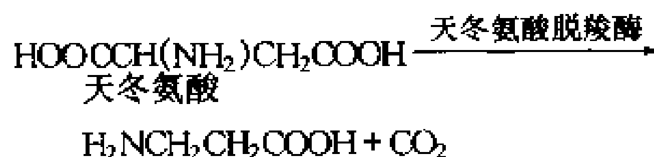
因 L-氨基酸氧化酶的活性不高而不起重要的作用，然而生物体内的 L-氨基酸可先由转氨酶催化，使其与 α-酮戊二酸反应而变为相应的酮酸及谷氨酸，生成的谷氨酸经谷氨酸脱氢酶和辅酶 NAD^+ 或 $NADP^+$ 的作用，重新变成 α-酮戊二酸。实际上 α-酮戊二酸扮演着氨基的传递体。

（二）脱羧基作用

在氨基酸脱羧酶的催化作用下，氨基酸脱羧生成 CO_2 和伯胺类化合物的反应，除了组氨酸之外，均需磷酸吡哆醛作辅酶。通常，一种脱羧酶仅对一种氨基酸起脱羧催化作用。例如：

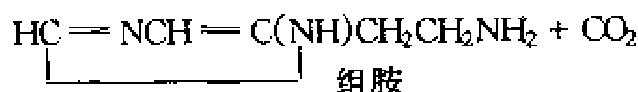


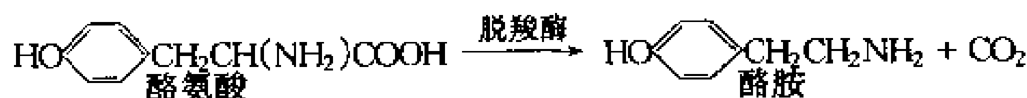
γ-氨基丁酸对中枢神经系统的传导有抑制作用。



β-丙氨酸是维生素泛酸(B_5)的组成成分。







组胺能使血管舒张，从而降低血压。酪胺会使血压升高。如果体内胺类过多，会引起胺中毒性神经或心血管等系统的功能紊乱。不过，

体内有胺氧化酶可以催化胺类氧化成醛，尔后醛又被氧化为脂肪酸，再分解成 CO_2 和 H_2O，而 CO_2 由肺部呼出。但有一部分胺类仍随尿排出。

（三）氨基酸分解产物的代谢

氨在动物体内是有毒物质，不宜存积。各种动物排泄氨的方法各异，哺乳动物主要依靠肝脏中酶催化氨代谢，即迅速地转变为尿素而排出。

氨基甲酰磷酸合成酶Ⅰ或Ⅱ以 N-乙酰谷氨酸别构激活剂或谷氨酰胺为氮源，有 2 分子 ATP 参与反应的过程中，将一分子 NH_3 和一分子 CO_2 首先合成氨基甲酰磷酸 NH_2COOⓅ，然后在鸟氨基甲酰移换酶催化下，将氨基甲酰基转移给鸟氨酸而生成瓜氨酸。继而在 ATP 与 Mg^{2+} 存在下由精氨琥珀酸合成酶催化，瓜氨酸可与天冬氨酸缩合成精氨琥珀酸，又经精氨琥珀酸裂合酶催化分解成精氨酸和延胡索酸。再由精氨酸酶的催化，精氨酸水解产生尿素和鸟氨酸。精氨酸酶的专一性很强，它只对 L-精氨酸具有催化作用。

此外，氨基甲酰磷酸可与天冬氨酸缩合而得氨甲酰天冬氨酸，经环化形成二氢乳清酸，最后合成嘧啶类化合物尿苷酸。

还有脑、肝和肌肉等组织中的谷氨酰胺合成酶在 Mg^{2+} 与 ATP 的参与下，可以催化谷氨酸与氨反应合成谷氨酰胺，从而解除氨毒。谷氨酰胺随血液送至肾脏，经谷氨酰胺酶作用分解出 NH_3 从尿中排出。有的谷氨酰胺经酶催化可以转化为嘧啶类化合物。

在植物体中，氨可由天冬酰胺合成酶催化而与天冬氨酸反应生成天冬酰胺。当合成氨基酸需要氨时，又可通过天冬酰胺酶作用而从天冬酰胺分子内取出。

α-氨基酸脱氨后生成的 α-酮酸在酶催化下可重新合成氨基酸或转变成糖和脂肪，也能被氧化成 CO_2 和 H_2O。

3.4.3 氨基酸的合成代谢

植物和绝大多数微生物皆能合成全部氨基酸，而人类必须靠食物供给的氨基酸是赖氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、亮

氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、精氨酸和组氨酸。

(一) 固氮酶作用

生物的固氮酶作用是指许多微生物能把分子氮 N_2 转化为氨态氮的作用。这种微生物可分为两类:一类是能独立生存的非共生微生物,如固氮菌、巴氏梭菌、蓝绿藻等;另一类是与其它植物(宿主)共生的微生物,如与豆科植物共生的根瘤菌,与非豆科植物共生的放线菌以及与植物叶片共生的叶瘤菌等。两类固氮微生物都含有可将氮分子还原为氨功能的固氮酶。

固氮酶是由两种蛋白质组成的:一种是含铁的称铁蛋白;另一种是含钼和铁的称钼铁蛋白。这两种蛋白务必同时存在,固氮酶方具有固氮功能,否则就没有催化活性。

根据实验证明,丙酮酸在固氮微生物的固氮作用中既提供能量又作为供氢体,在氧化脱氢酶系的催化下可以放出一对氢原子,再由氢化酶催化为 H^+ 和 e^-,然后通过电子传递体的传递。不同固氮微生物有不同的电子传递体,例如巴氏梭菌中有铁氧还蛋白;固氮菌中有铁硫蛋白和黄素蛋白。铁蛋白得电子即变成还原型铁蛋白,又传递给钼铁蛋白则复原而成为氧化型铁蛋白,所以 N_2 的还原是在钼铁蛋白的活性位上。ATP 参与提供能量而活化电子和将被还原的 N_2。其作用原理见图 3-6。

(二) 硝酸盐和亚硝酸盐的还原

植物和微生物的细胞质中,硝酸还原酶可催化硝酸盐(NO_3^-)还原为亚硝酸离子(NO_2^-)。该酶含有钼和黄素的 FAD 辅酶是属于钼黄素蛋白类,FAD 和 $Mo^{+5} \rightleftharpoons Mo^{+6}$在酶催化反应中起着电子传递体的作用,而 NADH 起了供氢体的作用。

亚硝酸盐还原成氨的过程是由叶绿体中亚硝酸还原酶催化的,其电子来自还原型铁氧还蛋白,但催化反应的机理尚未弄清。

$3CH_3C(=O)-SCoA + CO_2 + 6H \leftarrow$ 丙酮酸脱氢酶系 — $3HOOCC(=O)CH_3 + HS-CoA$ 丙酮酸

乙酰辅酶 A

3[铁氧还蛋白]　3[还原型铁蛋白·2e]　3[钼铁蛋白]　$2N^{-3}$ → $2NH_3$

3[铁氧还蛋白·2e]　3[氧化型铁蛋白]　3[钼铁蛋白·2e]　N_2

$ATP + Mg^{2+}$　$ADP + P_i + Mg^{2+}$

固氮酶系

6H

图 3-6　固氮酶系固氮作用示意

(三) 合成氨基酸的主要途径

在 L-谷氨酸脱氢酶的催化下,动物以还原型 NADH 或 NADPH 为辅酶(植物以 NADPH 为辅酶)供氢,加速氨与 α-酮戊二酸反应生成谷氨酸,其反应方程式为

$$NH_3 + HOOC(CH_2)_2C(=O)COOH + NAD(P)H + H^+ \rightleftharpoons HOOC(CH_2)_2CH(NH_2)COOH + NAD(P)^+ + H_2O$$

谷氨酸能与多种 α-酮酸通过转氨酶催化而形成相应的各种 α-氨基酸[RCH(NH$_2$)COOH],反应式如下:

$$HOOC(CH_2)_2CH(NH_2)COOH + RC(=O)COOH \xrightleftharpoons{\text{转氨酶}} HOOC(CH_2)_2C(=O)COOH + RCH(NH_2)COOH$$

20 种氨基酸中唯有苏氨酸和赖氨酸的氨基不是以转氨途径获得的。

有的氨基酸之间可以相互转化,例如半胱氨酸与胱氨酸互变,这是辅酶 $NADH + H^+ \rightarrow NAD^+$ 和谷胱甘肽(GSH→GS-SG)参加作氧化还原剂。单向转代之例是苯丙氨酸在苯丙氨酸羟化酶的催化下,经羟化作用而生成酪氨酸。

3.5 糖代谢中的酶

现将糖酵解中酶催化反应的平衡常数列于表 3-3,并可参阅 1.4

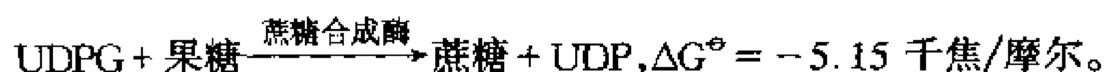
生物体内糖代射。

表 3-3　糖酵解酶类及酶促反应平衡常数

反　　应	酶	辅助因子	平衡常数	$\Delta G^{\ominus'}$ (千焦/摩尔)
(1)葡萄糖→6-磷酸葡萄糖	葡萄糖激酶	Mg^{2+}, ATP	650	-16.7
(2)6-磷酸葡萄糖→6-磷酸果糖	磷酸己糖异构酶		0.5	1.67
(3)6-磷酸果糖→1,6-二磷酸果糖	磷酸果糖激酶	Mg^{2+}, ATP	220	-14.2
(4)1,6-二磷酸果糖→磷酸二羟丙酮	醛缩酶		10^{-4}	23.8
(5)磷酸二羟丙酮→3-磷酸甘油醛	磷酸丙糖异构酶		0.075	6.28
(6)3-磷酸甘油醛→1,3-二磷酸甘油酸	3-磷酸甘油醛脱氢酶	NAD^+, H_3PO_4	0.08	6.3
(7)1,3-二磷酸甘油酸→3-磷酸甘油酸	磷酸甘油酸激酶	Mg^{2+}, ATP	1500	-18.8
(8)3-磷酸甘油酸→2-磷酸甘油酸	磷酸甘油酸变位酶	2,3-二磷酸甘油酸	0.02	4.2
(9)2-磷酸甘油酸→磷酸烯醇式丙酮酸	烯醇化酶	Mg^{2+}	0.5	1.67
(10)磷酸烯醇式丙酮酸→烯醇式丙酮酸	丙酮酸激酶	Mg^{2+}, ADP	2×10^5	-31.4
(11)丙酮酸→乳酸	乳酸脱氢酶	NADH	1.6×10^4	-25.1

糖的合成代谢是绿色植物和光能细菌进行光合作用的结果。合成蔗糖主要有两条途径:

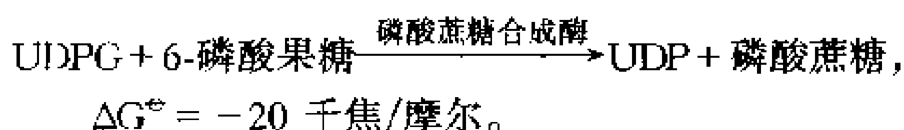
蔗糖合成酶利用尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG)供给葡萄糖与果糖合成蔗糖,其反应的平衡常数 K=8(pH=7.4 时),即



$$UDPG + 果糖 \xrightarrow{蔗糖合成酶} 蔗糖 + UDP, \Delta G^{\ominus} = -5.15\ 千焦/摩尔。$$

尿苷二磷酸葡萄糖是1-磷酸葡萄糖及尿苷三磷酸(UTP)在UDPG焦磷酸化酶催化下生成的。

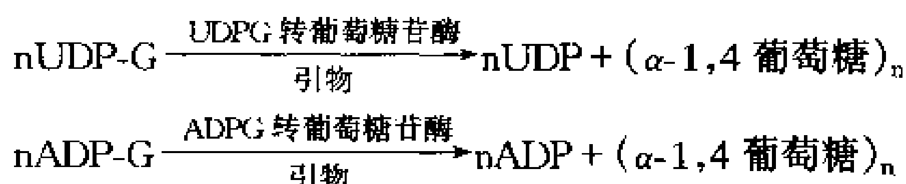
磷酸蔗糖合成酶也利用UDPG供给葡萄糖与果糖磷酸酯合成蔗糖磷酸酯,其平衡常数K=3250(pH=7.5时)。后经磷酸酯酶作用脱去磷酸而生成蔗糖。



$$\text{UDPG}+6\text{-磷酸果糖}\xrightarrow{\text{磷酸蔗糖合成酶}}\text{UDP}+\text{磷酸蔗糖},$$

$$\Delta G^{\ominus}=-20\ \text{千焦/摩尔}。$$

与淀粉合成有关的酶类主要是尿二磷葡萄糖转葡萄糖苷酶和腺二磷葡萄糖转葡萄糖苷酶。



$$n\text{UDP-G}\xrightarrow[\text{引物}]{\text{UDPG 转葡萄糖苷酶}}n\text{UDP}+(\alpha\text{-1,4 葡萄糖})_n$$

$$n\text{ADP-G}\xrightarrow[\text{引物}]{\text{ADPG 转葡萄糖苷酶}}n\text{ADP}+(\alpha\text{-1,4 葡萄糖})_n$$

后者是高等植物合成淀粉的主要途径。引物分子可以是麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖或淀粉分子,它的功能是以α-1,4糖苷键连接α-葡萄糖受体。

植物还有Q酶,可以催化α-1,4糖苷键转换为α-1,6糖苷键而形成有支链淀粉。

糖原是动物机体的典型多糖,它的生成过程与淀粉合成相似。

3.6 核酸代谢中的酶作用

3.6.1 酶催化核酸降解

在生物体中普遍存在着分解核酸的酶系,作用于核酸链内部连接核苷酸的磷酸二酯键,能加速水解断裂而产生低级多核苷酸和单核苷酸的酶称为核酸(内切)酶。作用于DNA的脱氧核糖核酸酶和作用于RNA的核糖核酸酶也属于此类。

还有一些酶能从DNA和RNA(或其低级多核苷酸)链的一端逐个水解下单核苷酸,这种对DNA和RNA之水解都可催化的磷酸二

酯酶的专一选择性较低,常称核酸外切酶。

现已发现一类能识别 DNA 特定核苷酸顺序的 DNA 限制性内切酶,它可在特定核苷酸顺序处切开核苷酸之间的键,使 DNA 断成双链段,进而被脱氧核酸酶水解。

细胞内磷酸单酯酶可以水解各种单核苷酸成为核苷与磷酸。核苷一般要经磷酸解反应生成嘌呤碱和嘧啶碱以及 1-磷酸戊糖。

腺苷经腺苷脱氨酶(有的是腺苷酸脱氨酶,牛中含腺嘌呤酶)、核苷磷酸化酶、黄嘌呤氧化酶等逐步催化变成醇式尿酸。

鸟苷经核苷磷酸化酶、鸟嘌呤酶(水解脱氨)、黄嘌呤氧化酶等逐步进行酶催化而生成醇式尿酸。

尿酸(酮式)是人、猿类及鸟类等体内嘌呤代谢的产物,通常尿酸的进一步分解因不同动物而异,或经尿酸氧化酶催化成尿囊素,或者再被尿囊素酶催化成尿囊酸,或者又由尿囊酸酶分解为尿素和乙醛酸,或者进一步由尿素酶将尿素变为氨与 CO_2。否则,尿酸易在血液中积累。

嘧啶的分解步骤中部分有 $NADPH+H^+$ 辅酶参与,分别产生 β-丙氨酸和 β-氨基异丁酸,还有 NH_3 和 CO_2 排出。

3.6.2 核苷酸生物合成的酶系

通常,动物、植物或微生物都能合成各种嘌呤和嘧啶核苷酸,其合成途径基本有两类:一类是从氨基酸、磷酸核糖、CO_2 和 NH_3 等合成核苷酸;另一类从核酸分解产物嘌呤、嘧啶和核苷也可合成核苷酸。前者合成嘌呤的途径已由 Greenberg 等人基本搞清。表 3-4 示出合成嘌呤核苷酸所需的各种酶,概括至少约有 20 种。

嘧啶核苷酸的合成步骤中所需之酶系可见表 3-5。

在大肠杆菌中存在核苷二磷酸还原酶和硫氧还蛋白还原酶所组成的酶系,前者能催化核糖核苷酸,使它与硫氧还蛋白的还原态发生反应,从而还原生成脱氧核苷酸;后者在 $NADPH+H^+$ 的协同作用下,可催化硫氧还蛋白的氧化态复原成硫氧还蛋白还原态。

表 3-4　合成嘌呤核苷酸所需的酶及其催化反应

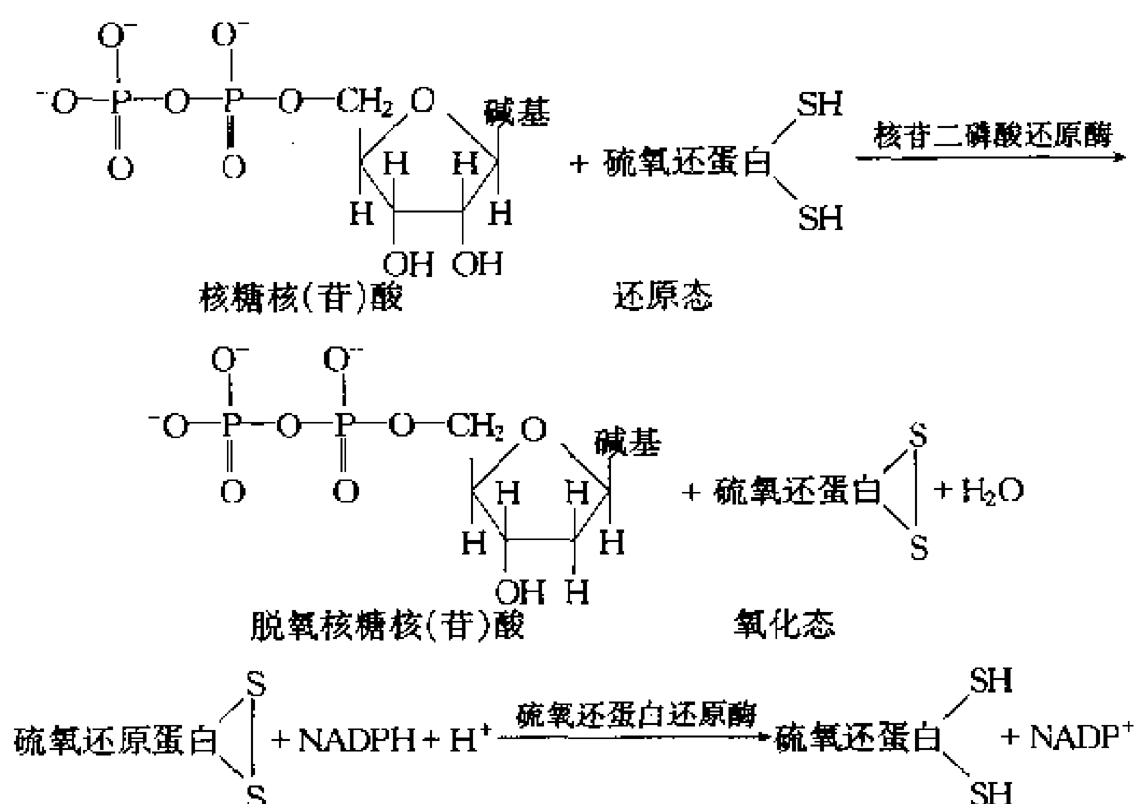
酶	反应物	主要产物	辅因子
磷酸核糖焦磷酸激酶	5-磷酸核糖,ATP	5-磷酸核糖焦磷酸(PRPP)	ATP
磷酸核糖焦磷酸酰胺基转移酶	PRPP,谷氨酰胺	5-磷酸核糖胺($\alpha \to \beta$型),谷氨酸,无机焦磷酸(PP_i)	
磷酸核糖甘氨酰胺合成酶	5-磷酸核糖胺,甘氨酸	5′-磷酸核糖甘氨酰胺	ATP
磷酸核糖甘氨酰胺甲酰基转移酶	5′-磷酸核糖甘氨酰胺,甲酰-N^5,N^{10}-四氢叶酸	5′-磷酸核糖-N-甲酰甘氨酰胺,四氢叶酸	
磷酸甲酰甘氨脒合成酶	5′-磷酸核糖-N-甲酰甘氨酰胺,谷氨酰胺	5′-磷酸核糖-N-甲酰甘氨脒,谷氨酸	ATP
磷酸核糖氨基咪唑合成酶	5′-磷酸核糖-N-甲酰甘氨脒	5′-磷酸核糖-N-氨基咪唑	
磷酸核糖氨基咪唑羧化酶	5′-磷酸核糖-N-氨基咪唑,CO_2	5′-磷酸核糖-5-氨基-4-羧酸咪唑	
磷酸核糖氨基咪唑琥珀酸甲酰胺合成酶	5′-磷酸核糖-5-氨基-4-羧酸咪唑,天冬氨酸	5′-磷酸核糖-5-氨基-4-(N-琥珀酸甲酰胺)咪唑	ATP
腺苷酸裂解酶	上一步产物	5′-磷酸核糖-5-氨基-4-甲酰胺咪唑,延胡索酸	
磷酸核糖氨基咪唑甲酰胺甲酰基转移酶,次黄苷酸环水解酶	5′-磷酸核糖-5-氨基-4-甲酰胺咪唑,甲酰-N^5,N^{10}-四氢叶酸	次黄苷酸(IMP),四氢叶酸	
腺苷酸琥珀酸合成酶	次黄苷酸,天冬氨酸	腺苷酸琥珀酸	GTP
腺苷酸琥珀酸裂解酶	腺苷酸琥珀酸	腺苷酸(AMP),延胡索酸	
次黄苷酸脱氢酶	次黄苷酸	黄苷酸	
鸟苷酸合成酶	黄苷酸,谷氨酰胺	鸟苷酸(GMP)	ATP

续表

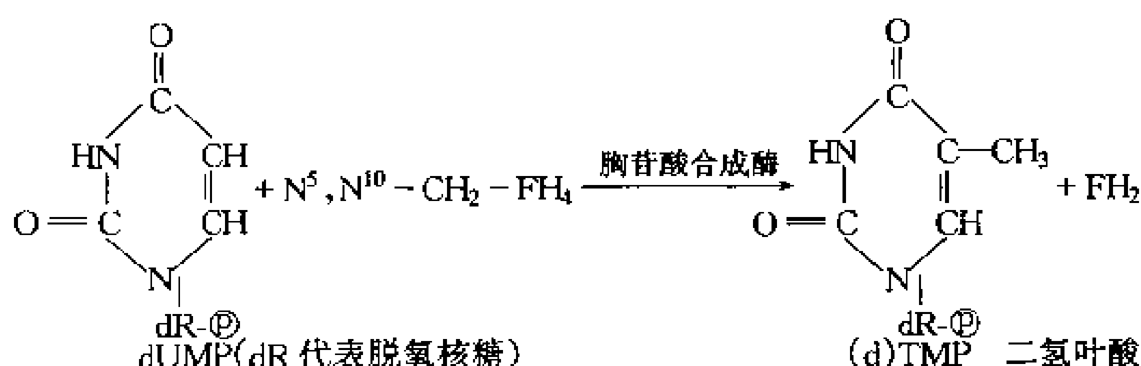
酶	反应物	主要产物	辅因子
腺嘌呤磷酸核糖基转移酶	腺嘌呤，5-磷酸核糖焦磷酸(PRPP)	腺苷-5-磷酸	
次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶	次黄嘌呤，PRPP	黄苷-5′-磷酸	
鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶	鸟嘌呤，PRPP	鸟苷-5′-磷酸	
鸟嘌呤核苷磷酸化酶	鸟嘌呤，核糖-1-磷酸	鸟苷	
次黄嘌呤核苷磷酸化酶	次黄嘌呤，核糖-1-磷酸	次黄苷	

表 3-5　合成嘧啶核苷酸所需之酶系及其催化反应

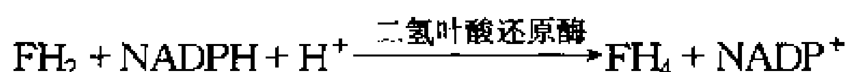
酶	反应物	主要产物	辅因子
氨甲酰磷酸合成酶	CO_2，谷氨酰胺	氨甲酰磷酸	ATP
转氨甲酰酶	氨甲酰磷酸，L-天冬氨酸	氨甲酰天冬氨酸	
二氢乳清酸酶	氨甲酰天冬氨酸	二氢乳清酸	
二氢乳清酸脱氢酶	二氢乳清酸，O_2	乳清酸	
乳清苷酸焦磷酸化酶	乳清酸，PRPP	乳清苷酸，焦磷酸	
乳清苷酸脱羧酶	乳清苷酸	UMP，CO_2	
尿苷酸激酶	UMP	UDP	ATP
核苷二磷酸激酶	UDP	UTP	ATP
CTP 合成酶	UTP，谷氨酰胺	CTP	ATP
尿嘧啶磷酸核糖基转移酶	尿嘧啶，PRPP	UMP	
尿苷激酶	尿苷	UMP	ATP，Mg^{2+}
尿苷磷酸化酶	尿嘧啶	尿苷	

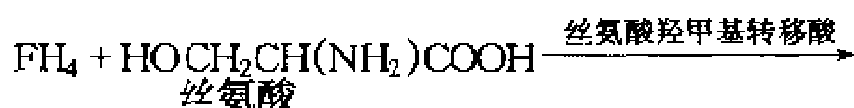


上述例子表明:酶催化反应往往是多种酶联合作用的结果。又如胸苷酸合成酶、二氢叶酸还原酶和丝氨酸羟甲基转移酶所组成的酶系,可连续地催化脱氧尿苷酸(dUMP)进行甲基化反应,从而转变为胸苷酸(TMP)。该反应中的甲基是 N^5,N^{10}-亚甲基-四氢叶酸(N^5,N^{10}-CH_2-FH_4)在上述胸苷酸合成酶催化下提供的,即



接着二氢叶酸还原酶在 NADPH + H^+ 的存在下,将二氢叶酸还原成四氢叶酸,继而由丝氨酸羟甲基转移酶催化,与丝氨酸反应复原为 N^5,N^{10}-CH_2-FH_4,又可为上述的甲基化反应继续提供甲基。





目前已发现生物界具有专一性催化功能的各种酶约2000多种。还有呼吸链中的酶系，DNA合成的各种酶，RNA合成的各种酶等，在此无法都介绍，请看有关专业书刊。

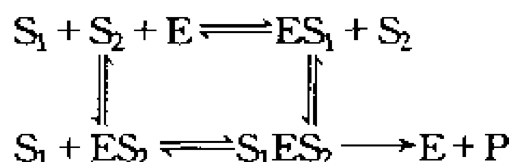
3.7 双底物的反应历程

上述的酶催化有不少是双底物(其中有一个可能是辅酶)反应。它们包括氨基转移酶、脱氢酶和磷酸转移酶等催化的反应。

3.7.1 双底物酶催化途径的模型

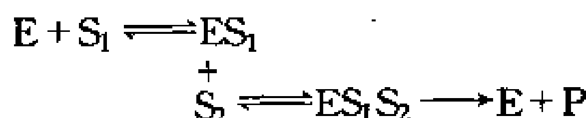
这类酶反应的反应方式和历程，可按是否生成三元络合物而分两大类：连续机制和乒乓机制。连续机制中又包括有序和随机等类型。

(1) 随机模型



该途径是假设酶上有两个截然不同的部位，两个底物各自分别与其中相应的一个部位结合，而且彼此互不影响，任何一个底物都可首先与酶起反应，产物可以是一个或二个，这类机理的例子是许多磷酸转移酶(如肌酸激酶、酵母己糖激酶)。

(2) 按序途径

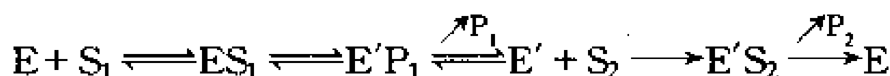


底物按严格的次序与酶结合，这种机理类型的例子是许多依赖 NAD^+ 辅酶的脱氢酶，它们首先与 NAD^+ 结合，然后只能与可氧化的底物结合。

(3) 中间产物途径



(4) 酶变化的中间产物途径



在随机途径中底物 S_1 和 S_2 结合的次序是随机的，务必两种底物全结合于酶上才发生相互反应而生成产物。

在按序途径中，一种底物(如 S_1)必须先于第二种底物与酶结合，然后方能有效地结合第二种底物，促进其反应而分离出产物。

在中间产物途径中，一个底物先与酶结合并进行酶催化反应而生成结合于酶上的"中间产物"，导致第二个底物的结合而进行另一反应才能得到产物。

在酶变化的中间产物途径中，第一个底物先与酶结合并相互作用，促使形成一种变化酶 E′和产物 P_1，脱去 P_1 的变化酶 E′又能与第二个底物 S_2 结合，催化 S_2 即转变为产物 P_2，最后 P_2 从酶上解离而 E′恢复为原来的酶 E。

上述四种模型都可分别用稳态处理法得到不同的动力学方程来描述，但情况往往是十分复杂的。作为简单的按序途径，其反应初速度的特征动力学方程通式是

$$\frac{1}{v}=\frac{K_{MS_1}}{v_m}\frac{1}{[S_1]}+\frac{K_{MS_2}}{v_m}\frac{1}{[S_2]}\left(1+\frac{K_{eqs_1}}{[S_1]}\right)+\frac{1}{v_m} \tag{3.7-1a}$$

或

$$\frac{1}{v}=\frac{1}{v_m[S_1]}\left(K_{MS_1}+\frac{K_{MS_2}K_{eqs_1}}{[S_2]}\right)+\frac{K_{MS_2}}{v_m[S_2]}+\frac{1}{v_m} \tag{3.7-1b}$$

式中 K_{MS_1}、K_{MS_2}——分别代表 S_1 和 S_2 的米氏常数；

K_{eqs_1}——代表 ES_1 复合物的解离常数。

将它与(3.2-8c)单底物反应动力学方程比较,可看出两者的差别在于等号右边有第二项。若强调酶在两种状态间变化的途径(4)可称为“乒乓历程”,并可用下述方程表示。这类酶往往是别构酶。

$$\frac{1}{v}=\frac{K_{MS_1}}{v_m}\frac{1}{[S_1]}+\frac{K_{MS_2}}{v_m}\frac{1}{[S_2]}+\frac{1}{v_m} \tag{3.7-2}$$

如以$\frac{1}{v}$对$\frac{1}{[S_1]}$作图,在连续机制按序途径情况下,随着$[S_2]$的增大可得到的各直线斜率和$\frac{1}{v}$轴上截距都降低(参见图 3-7(a)),而各直线的交点在 X 轴上下位置由 K_{eqs_1}、K_{MS_1}和 K_{MS_2}值决定。对于确定$[S_2]$一些值的条件下,通过一组直线在 Y 轴上截距和它们的斜率,以及在 X 轴上的一组截距就能从联立方程中求得 K_{eqs_1}、K_{MS_1}、K_{MS_2}和 v_m 值。

对于“乒乓机制”,在不同$[S_2]$条件下,将$\frac{1}{v}$对$\frac{1}{[S_1]}$所作的图形(见图 3-7(b))是一组平行线,其斜率未变,通过$[S_2]$的两种浓度和$\frac{1}{[S_1]}\to 0$ 时直线截 Y 轴所得截距,联立求解可求得 K_{MS_1}、K_{MS_2}和 v_m。

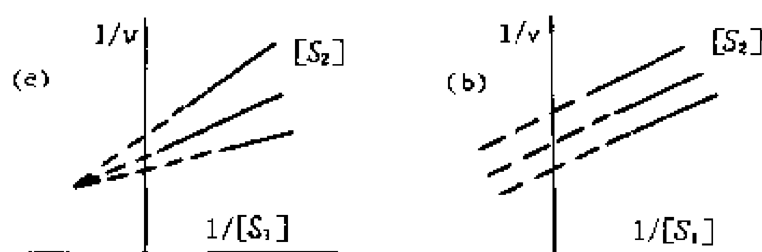


图 3-7 双底物反应双倒数作图

(a)连续机制; (b)乒乓机制

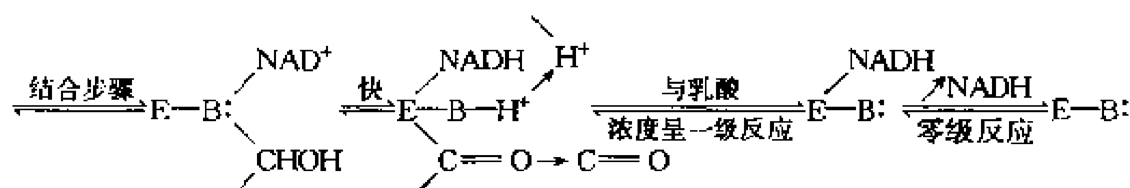
酶变化的中间产物途径(4)是另一种变化酶形式的有序途径。某些膜传递蛋白也被认为是以乒乓机制起作用的。

乳酸脱氢酶和天冬氨酸转氨甲酰酶的反应是按序途径(2)的实例。

3.7.2 乳酸脱氢酶催化乳酸的氧化反应

L-乳酸脱氢酶(LDH)利用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)来对乳酸的氧化反应,符合前面所介绍的途径(2)稳态处理的动力学通式。

辅酶 NAD^+ 先与 LDH 结合，使酶的结构产生一种变化。X-射线结构研究推测，从 98 到 120 残基组成的环有较大移动,可将辅酶和底物围在其中。Arg 171 和 Arg 109 的胍基移动会与底物周围的基团有密切作用,His 195 在活性部位与底物相接触,这为乳酸提供一个活性结合位点,使辅酶和底物在酶表面定向,烟酰胺上的 C-4 原子朝向底物的反应碳原子。荧光测定发现,NADH 在 340 nm 处有一特征吸收,并激发于 470 nm 发射一弱荧光,一旦它与酶结合,则荧光大大增强。以 270 nm 到 305 nm 的光激发酶时,酶即在 350 nm 附近发射荧光，这是由酶上 Try 残基产生的，LDH 如果与辅酶结合,荧光便大幅度地减弱。利用光学上的变化,推测出 E—B: + NAD^+ + >CHOH 结合之后的三个步骤如以下所示:



反应式中 >CHOH ——代表乳酸;

>C=O ——代表丙酮酸。

这种模型表明还原型辅酶 NADH 从酶脱出是反应的限速步骤。

3.8 酶活性的影响因素

抑制剂可与底物、辅因子或一种酶发生各种形态的结合，从而抑制了酶的催化反应。不过，在此仅讨论与酶直接结合的抑制剂。这种抑制作用在实践上很重要，尤其对于确定酶的活性部位和控制酶活性是一有用的方法。因此，抑制剂将成为测定酶活性部位的探针。酶的活性部位通常只占整个酶分子的一小部分，活性中心定位的有力依据是从对酶的特异选择性抑制剂的研究中获得的。

3.8.1 抑制剂的影响

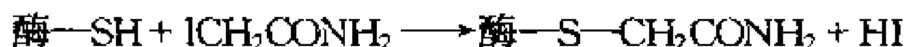
酶的抑制作用既可以是可逆的，也有不可逆的。

不可逆的抑制剂与酶反应产生一种不能离解的复合物，于是钝化了酶，以渗析无法恢复其催化活性。



$$E + I \longrightarrow EI$$

酶与抑制剂 I 是按不可逆结合反应的速度常数所确定的速度进行的，所以实验测定的催化活性抑制作用一般是递增的，直到抑制剂与酶所能结合的部位都起反应为止。碘乙酰胺的抑制作用就是此类型，它主要是与酶分子中半胱氨酸侧链—SH 基团形成 S—烷基共价键的结果。



$$\text{酶—SH} + ICH_2CONH_2 \longrightarrow \text{酶—S—}CH_2CONH_2 + HI$$

此外，还有某些有机磷化合物如二异丙基氟磷酸(DFP)，主要能与丝氨酸侧链如胰蛋白酶分子中丝氨酸 195 的—OH 基团形成稳定的丝氨酸酯，也是不可逆的抑制作用。这种抑制作用的机理与酶的变性或分解所引起的破坏性钝化是有区别的。

抑制剂与一种酶间若发生的是完全可逆的反应，那么抑制作的用是由 E、I 和 EI 间达到平衡时的组分所决定。



$$E + I \rightleftharpoons EI$$

一定量的酶由这种可逆抑制剂所引起的抑制作用程度与可逆抑制剂

浓度[I]和该可逆反应的平衡常数 K_{eq}(或 EI 的离解常数 K_i, $K_i = \frac{1}{K_{eq}}$)有关。这种被可逆性抑制的酶经过渗析,不断除去所释放的 I,最后即可恢复酶的催化活力。

可逆抑制剂所引起的抑制作用有多种机理,大体上可分为三类,即有竞争性、非竞争性和不竞争性的。它们有时很容易通过动力学分析来区别(见图 3-8),现以 1/v 对 1/[S]作图(称 Lineweaver-Burk 图)的直线特征,判定三类机理所给予不同的影响:

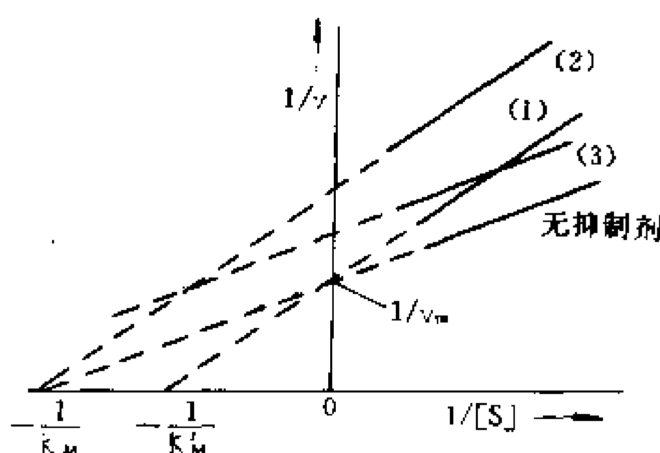


图 3-8 抑制剂对 1/v～1/[S]图形的影响

(1)竞争性;(2)非竞争性;(3)不竞争性。

竞争性抑制剂可以改变直线斜率,但不改变在 1/v 轴上的截距;

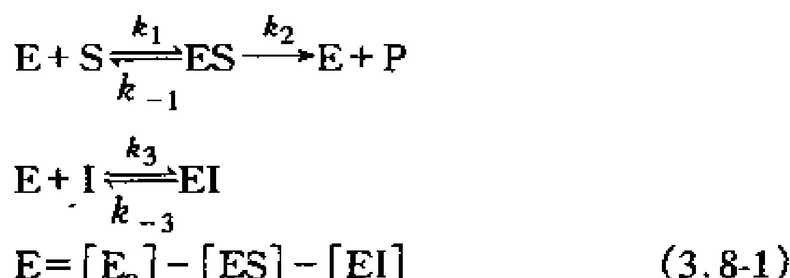
非竞争性抑制剂不仅改变它的斜率,而且又改变它在 1/v 轴上的截距;

不竞争性抑制剂只能改变直线在 1/v 轴上的截距而不改变它的斜率。

(一)竞争性抑制作用

在竞争性抑制作用中,大多数情况是这类抑制剂分子的结构和大小与底物相似,但在比较复杂的竞争性抑制情况中它们的结构通常并不相似。可是在较简单的情况下,由于抑制剂与底物皆能结合于酶的同一活性部位上形成复合物,因而发生了竞争。若以 I 代表

抑制剂，则



$$E+S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E+P$$

$$E+I \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} EI$$

$$E=[E_o]-[ES]-[EI] \tag{3.8-1}$$

因解离平衡常数

$$K_M=\frac{[E][S]}{[ES]},\ K_I=\frac{[E][I]}{[EI]} \tag{3.8-2}$$

则

$$[E]=\frac{K_M[ES]}{[S]},\ [EI]=\frac{[E][I]}{[K_I]}$$

将此代入(3.8-1 式)，整理后即得

$$[ES]=\frac{[E_o]}{\frac{K_M}{[S]}+1+\frac{K_M[I]}{K_I[S]}} \tag{3.8-3}$$

反应速度为

$$v=k_2[ES]=\frac{k_2[E_o]}{\frac{K_M}{[S]}+1+\frac{K_M[I]}{K_I[S]}} \tag{3.8-4}$$

当[S]很大时，$v_m=k_2[E_o]$，此式与没有抑制作用时是一样的。于是

$$v=\frac{v_m[S]}{[S]+K_M\left(1+\frac{[I]}{K_I}\right)} \tag{3.8-5}$$

或

$$\frac{1}{v}=\frac{K_M}{v_m}\left(1+\frac{[I]}{K_I}\right)\frac{1}{[S]}+\frac{1}{v_m} \tag{3.8-6}$$

令 $K_M\left(1+\frac{[I]}{K_I}\right)=K'_M$，对比无抑制剂时的(3.2-8c)式，可以得知竞争性抑制剂改变了 $\frac{1}{v}$ 对 $1/[S]$ 所作直线的斜率 K'_M/v_m，增加了 $(1+[I]/K_I)$ 因子，斜率与[I]呈直线正比关系，可称直线竞争性抑制作用，只有在[I]恒定时，K'_M 方是一个常数，然而在 $1/v$ 轴上的截距仍等于 $1/v_m$，其最高速度不变。

在直线竞争性抑制作用中，I 和 S 不能同时存在于酶的活性部位上，不是生成 EI 就是生成 ES，若酶能与底物结合的活性部位被 I 占领，则 ES 浓度必然比没有抑制剂时更小，因而总反应速度减低。于是$\frac{1}{v}$对$\frac{1}{[S]}$所作直线斜率会随 I 浓度的增加而增大，这与上述导出的(3.8-6)公式一致。由于抑制剂与底物争夺固定数量酶所提供的为数有限的活性部位，因此抑制程度取决于所加入的底物与抑制剂的浓度比，提高$\frac{[S]}{[I]}$比例，即增加底物浓度将会降低竞争性的抑制作用。

在更复杂的情况下，酶的活性部位与一分子 I 反应会导致第二个分子 I 接着反应，这二个分子 I 都会一起排斥 S，此时斜率对[I]的关系呈抛物线。

酶反应的竞争性抑制作用之例不少，如丙二酸是丁二酸脱氢酶的竞争性抑制剂。此外，还有苯甲脒离子是胰蛋白酶的竞争性抑制剂。质子化的苯甲脒离子的脒端和质子化的多肽链中精氨酸侧链一样，具有扁平不定位的 π 电子结构，故也能被酶中折叠弯曲所形成的专一性袋穴所接受和 Asp 189 带负电荷端结合，而苯甲脒环稍偏大会挡住任何有可能结合的肽链 α 碳之接近，于是成为有关部分结构的底物之竞争者，见图 3-9。

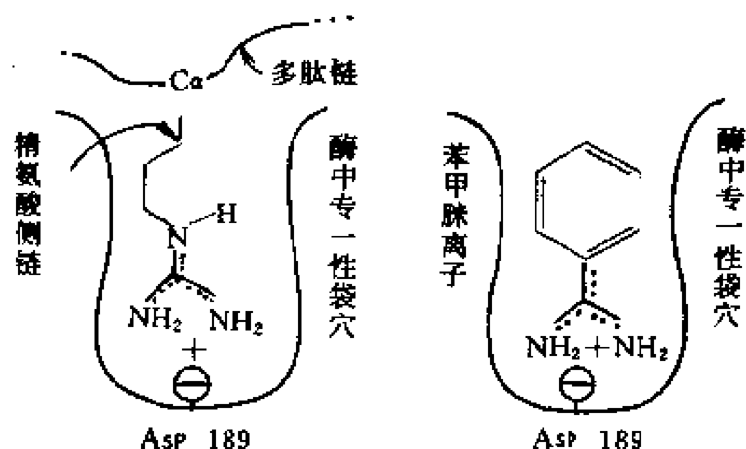


图 3-9　胰蛋白酶的专一性袋穴接纳底物的一个精氨酸侧链或苯甲脒离子

(二) 非竞争性抑制作用

采用非竞争性抑制剂的一系列固定浓度，作 1/v 对 1/[S]图时可得一组直线，这些直线的斜率和截距的大小是随抑制剂浓度的增加而增加，见图 3-10。当直线延长时，它们将交于纵轴左边某一点，这点可能是在 1/[S]横轴线上$\left(-\frac{1}{K_M}\right)$处，或者在其左侧或右侧。

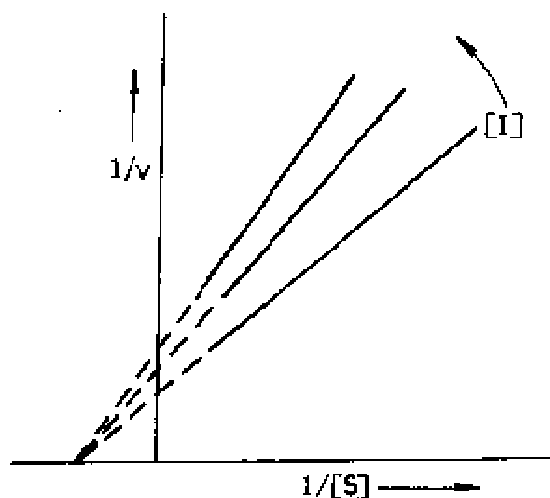


图 3-10　非竞争性抑制作用的(1/v 对 1/[S])Lineweaver-Burk 图

最简单的直线非竞争性抑制剂与酶的结合部位并非酶的活性部位。于是除了有 E 与 ES 之外，还可以有 IE 与 IES 复合物存在，IE 与 IES 均不会生成产物。但可逆抑制剂与 E 的复合物能可逆地离解成 I 和 E，设其平衡常数为 K_I，即



$$IE \rightleftharpoons I + E \quad , \quad K_{eq} = K_I$$

而 IES 复合物按二种方式离解：



$$IES \rightleftharpoons I + ES \quad K_{eq} = K'_I$$



$$IES \rightleftharpoons IE + S \quad K_M$$

推得动力学 1/v 对 1/[S]的方程为

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_m}\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_m}\left(1 + \frac{[I]}{K'_I}\right) \qquad (3.8\text{-}7)$$

当 $K'_I = K_I$ 时，1/v 对 1/[S]的初级曲线延长线正好截于 1/[S]轴上 $-\frac{1}{K_M}$处，而 $K_I > K'_I$ 时，1/[S]轴上的截点在$-\frac{1}{K_M}$之左侧；若 $K_I < K'_I$，则 1/[S]轴上的截点在$-\frac{1}{K_M}$的右侧。

如果将(3.8-7)公式中斜率对[I]和截距对[I]作图，可得次级曲

线亦是一组直线，由此可测得 K_I 和 K'_I 值，参见图 3-11。

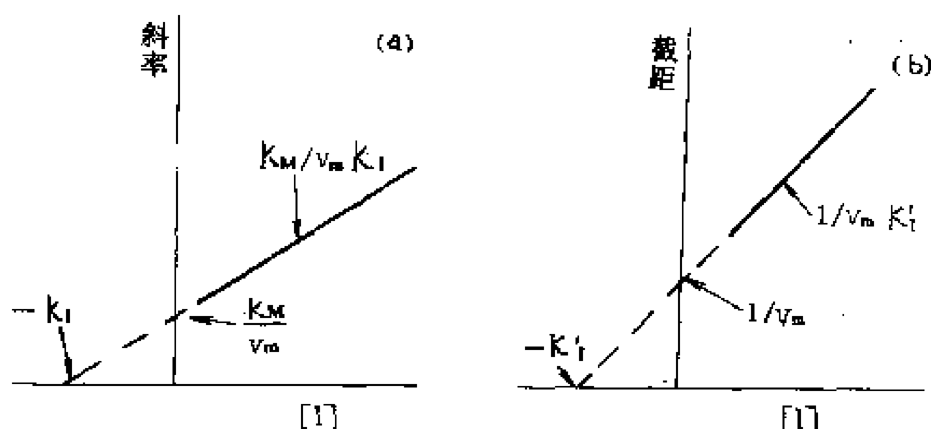


图 3-11　直线非竞争性抑制作用

(a)斜率对[I]和(b)截距对[I]的次级曲线

(三) 不竞争性抑制作用

Cleland 指出，不竞争性抑制剂与酶结合的 IES 是最终复合物，它只能离解成 I 和 ES，其平衡常数为 K'_I，底物 S 不会代替抑制剂与酶结合，因此增加 S 并不妨碍抑制剂与酶的适当部位结合，也就不能解除抑制作用。导出的公式为

$$\frac{1}{v}=\frac{K_M}{v_m}\frac{1}{[S]}+\frac{1}{v_m}\left(1+\frac{[I]}{K'_I}\right) \tag{3.8-8}$$

上述公式表明，增加[I]浓度会增加 $\frac{1}{v}$ 对 $\frac{1}{[S]}$ 所作直线在 1/v 纵轴上的截距 $\left(\frac{1}{v_m}\left[1+\frac{[I]}{K'_I}\right]\right)$，但不改变斜率($K_M/v_m$)，见图 3-12。如以截距对[I]作图得直线关系，就很容易求得 K'_I 值。

这种不竞争性抑制作用类型之经典例子，在单底物酶催化反应中并不多，但在多底物酶催化反应中却时常可见。

可逆性抑制剂对多底物系统的作用，也可按抑制剂对单底物反应之影响的同样方式进行考察，即可以将参与反应的各种反应物依次作为可变浓度的底物，而其它反应物的浓度固定，以此来测试抑制剂对该底物的影响是属于哪一类性质的。当第一种底物作为可变浓度时，它的生成物之一可能是竞争性抑制剂，而第二种底物为可变浓

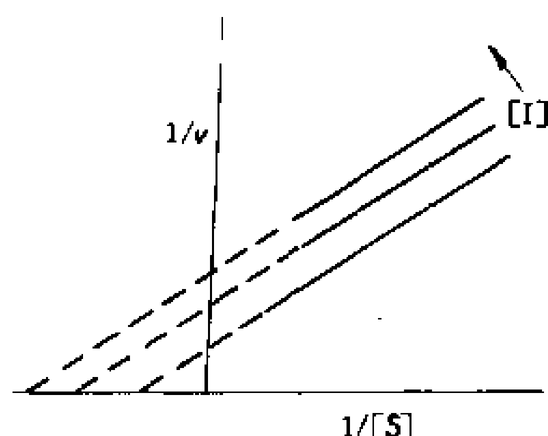


图 3-12　不竞争性抑制作用的酶促反应 1/v 对 1/[S]作图的特征

度时，上述的这个生成物变成不竞争性抑制剂。二底物反应也可能是另一种机理，当第一种底物为可变浓度时，它的一种生成物呈现出是竞争性抑制剂，而这种生成物对第二种底物为可变浓度进行测试时却成了非竞争性抑制剂。特别值得注意的是，测试实验中都采用起始浓度的起始速度，以免反应产物累积之干扰。不过，还是要关注酶催化反应的生成物对酶产生抑制作用的可能性，因为一种酶—生成物复合物有可能在脱离酶的生成物形成之前就产生了。

3.8.2　pH 的影响

自然界任何由酶催化的反应都是在特定 pH 条件下进行的，酶催化的反应速度或酶的催化活性随 pH 变化的典型曲线，通常如图 3-13(a)示意的峰形态，其峰顶是最适 pH 值。此外，pH 对酶的稳定性也有一定的影响，参见图 3-13(b)。

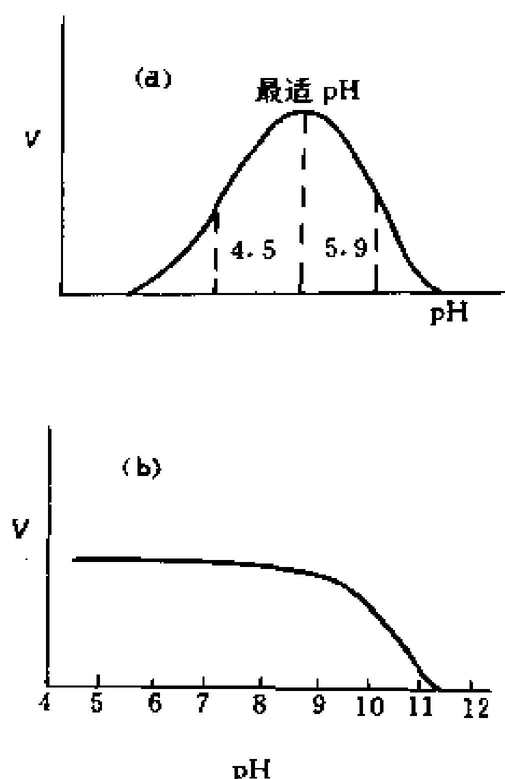
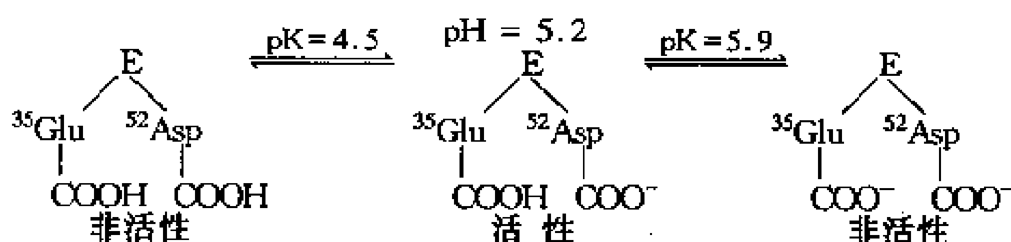


图 3-13　pH 对酶的影响
(a)pH-酶活性曲线；
(b)pH-酶稳定性曲线。

研究发现，各种酶催化反应都有其各自的最适 pH，不过，往往与酶蛋白的等电点不一致。某些酶的最适 pH 主要与活性中心侧链基团的解离有关，对酶

的部分修饰并不影响酶活性的最适 pH 值。

从 X 射线衍射分析得知，溶菌酶的活性中心含有 35 位的 Glu 和 52 位的 Asp 两个关键性侧链基团，当 Glu 处于非离解的—COOH 状态，而 Asp 处于—COO^-的离解状态时该酶才具有催化活性。测试得知，$pK_{Glu-COOH}$为 5.9 和 $pK_{Asp-COO^-}=4.5$ 时的溶菌酶最适 pH 是 5.2，即



上述发现表明，pH 对酶催化活性的影响可能是由于改变了酶的活性中心处与催化活性有关基团解离的状态和结构所致，也就是说，酶活性中心有关基团必须处于恰当的解离状态和高级结构的空间位置，否则便会破坏与活性有关基团的协同催化作用而使酶转成无活性状态。

pH 值对酶催化活性的影响类似于抑制剂的作用，因此，pH 对酶催化反应动力学关系的影响，也可当作抑制剂影响来讨论。

一般酶的最适 pH 在 4～8 之间。植物和微生物体内的酶，其最适 pH 范围在 4.5～6.5；动物体内酶的最适 pH 范围是 6.5～8，而且 pH 越接近 7 时的活性最高，但也有例外，如胃蛋白(水解)酶最适的 pH 为 1.9，胰蛋白酶的最适 pH 是 8.1，肝精氨酸酶的最适 pH 位于 9。不过，酶的最适 pH 不是固定的常数，它还会随其它条件(如底物的种类和浓度，酶的纯度和杂质的种类等。)有所变化。

各种酶均有一定的 pH 稳定性范围，在此范围外，酶便会变性而失去催化效应。图 3-13(b)是为了解酶在碱中的稳定性情况。

酶稳定性—pH 曲线的制作方法是，先将酶溶液等量地分成若干份，并把它们分别放入一系列不同的 pH 溶液中，保温一定时间后，再将此系列溶液调整至某一共同的 pH 值，继而对这些溶液分别进

行酶的活性测定。

由该实验所得的图 3-13(b)之酶稳定性-pH 曲线的形态表明,此酶在 pH>9 时,其稳定性(以酶催化反应速度表达)开始明显地下降。

3.8.3 温度的影响

酶反应常在温度 0℃～40℃ 范围内进行,如果分别在不同温度条件下进行某酶的催化反应实验,并测定其反应速度对温度作图,便可得到如图 3-14 所示的反应速度—温度曲线。

在较低温度范围内曲线呈现酶催化反应速度随温度升高而加快,当曲线达到反应速度最高点的一定温度时,催化反应速度便开始出现随温度升高而下降。此催化反应速度最高点所处的温度称为酶反应的"最适温度"。

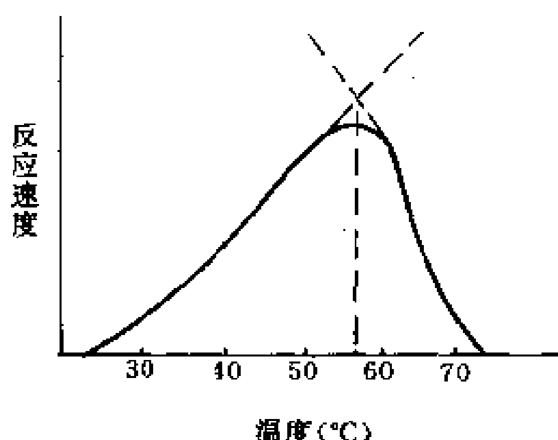


图 3-14 酶催化反应的最适温度

该曲线示出的酶催化反应速度之变化,是由于温度对反应速度和温度对酶蛋白变性的两种影响综合的结果所致。这种综合效应还与酶在一定温度下所经历的时间有关。温度升高既可加速酶的催化反应,在某一定温度以上(一般是超过 45℃ 后)也能加速酶蛋白的变性,但在反应的最初阶段,酶蛋白的变性尚未显现,此时催化反应速度仍随温度升高而增加。不过,随着反应时间的延长,酶蛋白的变性渐趋明显,反应速度随温度升高的效应将逐渐被酶蛋白变性的效应所"抵消"。于是在不同反应时间内测得的"最适温度"也就不同了,也就是说,"最适温度"是随反应时间的延长而降低。

Arrhenius 提出描写温度与反应速度常数 k 的经验定量关系式为

$$k = A \cdot e^{-E_a/RT} \tag{3.8-9}$$

式中　A——代表频率系数(即指前因子),它与分子碰撞次数和碰撞方位有关;

E_a——代表特定反应系统的活化能。

Arrhenius 的经验式也可以改写成

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad 或 \quad \log k = \log A - \frac{E_a}{2.303RT} \tag{3.8-10}$$

以 $\log k$ 对$\frac{1}{T}$作图可得一直线,此直线的斜率显然是 $-E_a/2.303R$,由此便可求得 E_a。该直线在$\frac{1}{T} \to 0$ 时,延长线对纵坐标 $\log k$ 上的截距为 $\log A$,A 也可求得。

对比生成活化络合物的过渡态理论的反应速度常数 k_2 与温度的关系式:

$$k_2 = \frac{kT}{h} \cdot e^{-\Delta G^{\neq}/RT} = \frac{kT}{k} \cdot e^{\Delta S^{\neq}/R} \cdot e^{-\Delta H^{\neq}/RT} \tag{3.8-11}$$

式中　$\Delta G^{\neq}$——代表形成活化络合物所需的活化自由能;

$\Delta S^{\neq}$——代表形成活化络合物的熵变,称作活化熵;

$\Delta H^{\neq}$——代表形成活化络合物所需的活化焓。

频率系数(即指前因子)A 相似于$\frac{kT}{h} \cdot e^{\Delta S^{\neq}/R}$,指数因子 $e^{-\frac{E_a}{RT}}$中的活化能 E_a 相似于活化焓。上述两种温度影响反应速度常数的关系式均表明,反应系统中的分子都需要获得一定能量,从而转变成瞬时的活化状态方能反应生成产物。升高温度有利于增加分子能量(包括动能),则 $e^{-E_a/RT}$或 $e^{-\Delta H^{\neq}/RT}$变大,即活化分子数目增多,且又能增加分子间碰撞频率,于是便可使反应加速。另一方面,酶等催化剂能通过不同的反应历程以不同方式降低反应活化能,从而促进反应加速进行。在不影响酶热稳定性的温度范围内升高温度,也可增加酶的能量而增加其催化活性。

表 3-6 列出了某些反应的活化能,可以看出酶能显著地降低活

化能，因此酶往往比其它催化剂效率更高，于是在温和的生理条件

表 3-6　某些反应的活化能比较

反　应	催 化 剂	活化能(kJ/mol)
H_2O_2 分解	无	75.2
	胶体铂	48.9
	Fe^{3+}	41.0
	过氧化氢酶	<8.4
乙酸丁酯水解	H^+	6.69
	OH^-	42.6
	胰脂肪酶	18.8
酪蛋白水解	H^+	83.6
	胰蛋白酶	50.2
蔗糖水解	H^+	104.5
	酵母蔗糖酶	33.4

(37℃,pH 接近 7)下仍能有效地促使反应以很高的速度进行。现以蔗糖水解为例,比较使用酶或 H^+ 进行催化反应的速度常数 k_E 和 k_H,由于

$$\log k_E = \log A - \frac{33400}{2.3RT}, \log k_H = \log A - \frac{104500}{2.3RT}$$

$R = 8.3\ J \cdot mol^{-1}K^{-1}$,设 $T = (273 + 37)K$,则

$$\log \frac{k_E}{k_H} = \frac{104500 - 33400}{2.3 \times 8.3 \times 310} = 12.01$$

$$k_E/k_H = 1 \times 10^{12}$$

k_E 比 k_H 大 10^{12}倍。

如果比较温度从 $T_1 = 295K$ 升高 10℃ 至 $T_2 = 305K$ 时,上述反应的酶催化反应速度常数比为

$$\log \frac{k_{E(T+10)}}{k_{E(T)}} = \frac{E_a}{2.3 \times 8.3}\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)$$

$$= \frac{33400}{2.3 \times 8.3}\left(\frac{10}{295 \times 305}\right) = 0.194$$

$k_{E(T+10)}/k_{E(T)}=1.56$，即 k_{E305} 比 k_{E295} 大 1.56 倍。

从单底物不可逆的酶催化过程之最简单机理进行探讨，温度变化将影响 $E+S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E+P$ 中所有三个速度常数。温度对 k_{-1}/k_1 的影响是在底物非饱和浓度情况下引起 ES 活化络合物过渡态浓度的变化；对 k_2 的影响是改变 ES 的分解速度。倘若在底物的饱和浓度下，[ES]也稳定在最大浓度上，如以 e_o 表示，则此时 ES 分解的反应速度 v_o 相当于酶的某一总浓度下最大催化反应速度，即

$$v_o=v_m=k_2e_o \tag{3.8-12}$$

在不同温度下作 $1/v_o$ 对 1/[S]曲线，可视察到酶在某一总浓度下最大催化反应速度随温度的变化值。由(3.8-10)式可得温度对 v_m 的影响公式

$$\log\frac{v''_m}{v'_m}=\log\frac{k''_2e_o}{k'_2e_o}=\log\frac{k''_2}{k'_2}=\frac{E(T_2-T_1)}{2.303RT_1T_2} \tag{3.8-13}$$

E(焦耳×摩尔$^{-1}$)可从 $\log v_m$ 与 T 关系式中求得。酶催化反应所需的活化能往往比其它催化剂催化的更低。根据(3.8-13)式可由已测得的 E，求出各种温度下的 v_m(或 k_2)，从而了解温度对 v_m(或 k_2)的影响。

通常动物体内酶催化的最适温度在 37℃左右范围内，而植物体内却可在稍高些温度范围。

3.8.4 激活剂的影响

实验发现，唾液淀粉(水解)酶的活性随着少量 Cl^- 的加入而大大地增加。这种能提高酶活性的物质称为激活剂。某些金属离子如 Mg^{2+}、Mn^{2+}、Co^{2+} 等也是一些酶的激活剂，例如核糖核酸(RNA)酶需要 Mg^{2+} 激活剂；脱羧酶需要 Mg^{2+}、Mn^{2+} 或 Co^{2+}；醛缩酶需要 Mn^{2+} 等。这些酶在制备过程中极易丢失无机离子，必须注意补充。一些巯基为活性基团的酶在分离提纯过程中，因巯基常被氧化而降低了其活性，如果加入抗坏血酸、半胱氨酸或谷胱甘肽等还原剂，便能使被氧化的巯基重新还原而恢复活性。

还有一种是组织细胞含可分泌的一些蛋白质，它们是活性酶的前体，可称为酶原，在组织细胞内或刚分泌出来时并没有催化活性，特别是某些与消化和水解作用有关的酶，它们没有催化水解和消化的活性，则在组织细胞内不会催化内含物水解而破坏细胞。这种酶原一旦分泌出来，并在一定条件下与适当物质作用，即可转变成有催化活性的酶。酶原转变为酶的过程称作酶的激活。

例如，胰蛋白酶刚从胰脏细胞分泌出来时，仅仅是一种没有催化活性的胰蛋白酶原，可是当它随着胰液进入小肠时，即可被肠液中的肠激酶激活或被胰蛋白酶激活。在肠激酶的作用下自 N 端水解脱下一个六肽，促使酶的构象发生某些变化，即组氨酸、异亮氨酸、丝氨酸等残基互相靠近，构成了活性中心，见图 3-15 的示意。

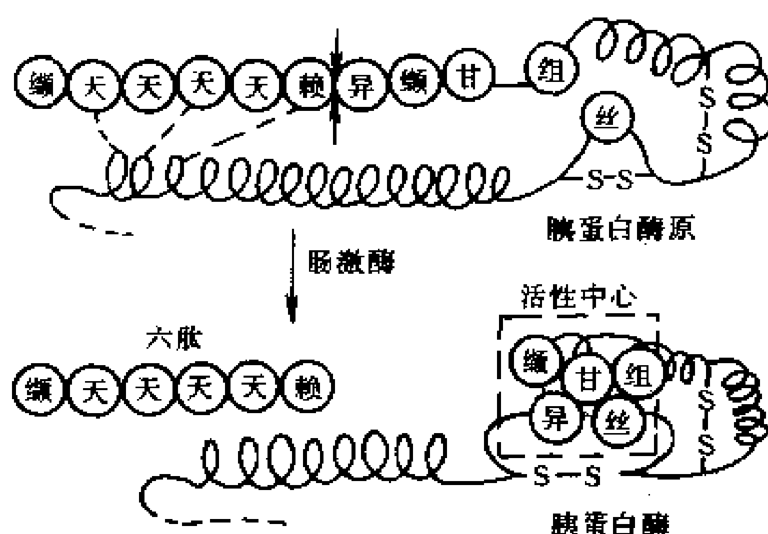


图 3-15　胰蛋白酶原激活示意

↨代表解脱位置

胃蛋白酶原是胃粘膜细胞所分泌的，其相对分子质量为 42000。该分子含有三对硫硫键，一个对胃蛋白酶有抑制作用的多肽片，它在 pH 高的条件下与胃蛋白酶以非共价键方式结合成酶原，致使胃蛋白酶原没有催化活性。胃蛋白酶原自胃粘膜细胞分泌到胃液中，在盐酸或已有活性的胃蛋白酶作用所形成的 pH 为 1～2 的条件下，这多

肽碎片很容易从胃蛋白酶原上解脱下来，酶原就变成了活泼的活性酶。

结　束　语

新陈代谢是天宇间的普遍规律，它在无机界的作用是破坏，但对生物有机体而言，是生命存在的必要条件。生物只有通过新陈代谢，方能生长发育、遗传变异，才有感应运动，方能适应外界条件的变化作出相应的应答，也才会有生物界色彩缤纷的性态。生物的这种物质交换如果终止，生命就伴之而结束。可见，新陈代谢是生命活动的基础。

新陈代谢必须通过大量的代学反应来实现，这些化学反应彼此联系、协同制约地构成一条条代谢途径，一张张代谢网络。生物体内的一切代谢反应均是在酶催化下进行的，酶所具有的特点是新陈代谢能够高速度、有条不紊地进行的基本保证。

酶是一种能强有力地改变新陈代谢中反应速度的生物催化剂，它的催化效率往往要比其它无机或有机催化剂高出 $10^7 \sim 10^{13}$ 倍。在已发现的约 3000 种酶中，各种酶都能在非常温和的条件下对新陈代谢反应或底物具有高度专一性催化作用。它们各自均有其专一性功能，大体上可概括为如下的六大类作用：

（1）催化氧化还原酶类或脱氢酶类，例如



$$\text{醇} + NAD^+ \xrightleftharpoons{\text{酶催化}} \text{醛或(酮)} + NADH + H^+$$

（2）转移酶类，例如



$$ATP + \text{D-己糖} \xrightleftharpoons{\text{酶催化}} \text{D-己糖-6-磷酸} + ADP$$

（3）水解酶类，例如



$$\text{天冬酰胺} + H_2O \xrightleftharpoons{\text{酶催化}} \text{天冬氨酸} + NH_3$$

（4）解（合）酶类，例如



$$\text{柠檬酸} \xrightleftharpoons{\text{酶催化}} \text{顺乌头酸} + H_2O$$

(5) 异构酶类($R \rightleftharpoons R'$),例如



(6) 合成酶类,例如



在正常情况下,生物体内各种功能的酶彼此既分工又合作,协调地发挥各自作用,是为生物机体的生存、发展和形形色色的生命活动提供物质和能量的基础。

若由于某种因素,例如来自外源的抑制剂,酗酒与酸碱失衡,氨中毒,或酶在自身新陈代谢中老化变异而来不及更新等,抑制了生物机体内某些酶的活性,甚至失去了一些酶,便会使生理失调而出现相应的病症。人体内的嘌呤类核苷在脱氨酶、磷酸化酶、氧化酶等的催化作用下变成尿酸,在正常情况下,尿酸又能被另一些酶催化而进一步分解。当这些酶由于某些因素的影响而使活性降低,甚至失活时,尿酸的分解反应即被抑制,往往易引起尿酸在血液中积累而超过允准量,它是产生关节痛的所谓痛风病症的原因之一。一旦生物体严重地失去酶的活性将导致生命的停止。因此,作为医药或营养品上使用的酶制品已成为当今国内外十分引人注目的研究领域。

第四章　生物代谢中的电子转移反应

生物机体活动所需能量，主要依靠体内糖、脂肪、蛋白质等有机物质的氧化作用，这类氧化称为生物氧化。通常的所谓呼吸，即是吸入氧用于氧化摄入体内的营养物质并呼出二氧化碳，这也是一种重要的生物氧化。任何氧化反应都伴随着还原反应，因此，反应中至少有氧化剂和还原剂两种反应物。氧化剂在反应中得到电子而被还原的同时，还原剂失去电子而被氧化，可见氧化还原反应就是还原剂将电子转移给氧化剂的电子转移反应。

4.1　电子转移反应的基本知识

倘若电子转移反应是可逆的，反应中化合物的还原型被氧化而转变为它的氧化型，两者构成共轭对偶，称之氧化还原电偶。在氧化还原电偶中，还原型组分称还原剂，其氧化型组分就是该还原剂的共轭氧化剂，即



还原剂(red_1)$\rightleftharpoons$共轭氧化剂$^{n+}$(ox_1) + ne　　(4.1-1)

同理，氧化剂被还原后形成它的共轭还原剂，也就是：



氧化剂$^{n+}$(ox_2) + ne$\rightleftharpoons$共轭还原剂(red_2)　　(4.1-2)

电子供体和电子受体之间的关系，相似于 Bröusted 或 Lowry 酸碱学说所指出的：酸(质子供体或电子对受体)和它的共轭碱(质子受体或电子对供体)的关系，同样，也类似于碱与共轭酸的关系。

式中　n——代表一分子还原剂所供出的电子(e)数，也可代表一摩尔还原剂所供出的电子数，摩尔。

4.1.1　氧化还原电池及电极电位

一个基元氧化还原反应，可以认为是(4.1-1)和(4.1-2)两个“半

反应”结果，又可视为，还原性电偶的还原剂将电子给予氧化性电偶的氧化剂所组成的两对氧化还原电偶间的电子转移过程。如果电子从 red_1 到 ox_2 的转移是在恒温恒压下自发进行的，那么系统内的吉布斯自由能会下降，即 ΔG 为负值，当系统的自由能降低至最低值（$\Delta G=0$）时，系统就达到平衡状态。假设此电子转移反应是在恒温恒压的热力学可逆情况下进行的，$-\Delta G$ 值便可作最大电功，参见（2.2-10）表达式。

若将上述两个“半反应”设计成两个“半电池”，还原性电偶为还原性半电池（A），氧化性电偶为氧化性半电池（B），即 A 含有一种还原剂溶液，B 含有一种氧化剂溶液，将能导电而不活泼的金属作电极，分别浸入这些溶液中，各自形成还原电极和氧化电极，且用导电金属丝把两电极连接，在两半电池溶液之间用能使不参与反应的离子传导电流的盐桥（高浓度 KCl/琼脂溶胶溶液）沟通，见图 4-1，如遇有能与 Cl^- 反应的溶液，可用 KNO_3/琼脂代替。由于氧化性电偶比还原性电偶具有更大的电子亲和力，电子亲和力较小的电偶必将电子转移给氧化性电偶而起还原作用，还原性电偶的还原剂被氧化，导线上就出现电子从还原性半电池（负极）流向氧化性半电池（正极）的趋势，即对电子亲和力之差产生了推动电流从正极向负极流动的电位（势）差。当盐桥接通两半电池时，便可让负电荷离子或正电荷离子流动，以补偿两半电池中（还原性半电池正电荷过剩，氧化性半电池负电荷过剩）正或负电荷过剩，即可发生负极到正极的自发电子流动，此发电装置通称原电池。

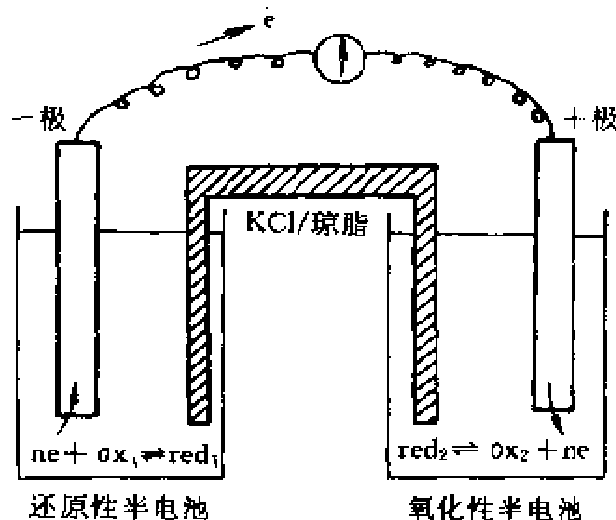
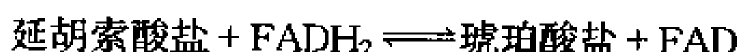


图 4-1　由氧化电偶和还原电偶构成的电池

根据以上所述，一个电池中两半电池电位(势)差是由于其两个半电池间对电子亲和力之差引起的，习惯将一对氧化还原电偶半电池称为电极，该电极对电子亲和力所呈现的势强称作它的还原电极电位。半电池对电子亲和力越大，它的还原电极电位值越大，所以还原电极电位是衡量一对氧化还原电偶进行还原反应(氧化型 + ne→还原型)的倾向。各种氧化还原电偶的半电池反应都可以写成上述还原反应的形式(缩写是氧化型/还原型)以强调得电子能力，反映对电子亲和力大小的还原电极电位 φ 可写为 $\varphi_{氧化型}/_{还原型}$，这是国际上通用的习惯，但也有些书籍采用氧化反应的形式，还原型→氧化型 + ne，即以氧化电极电位 $\varphi_{还原型}/_{氧化型}$数据整理，正负符号相反。

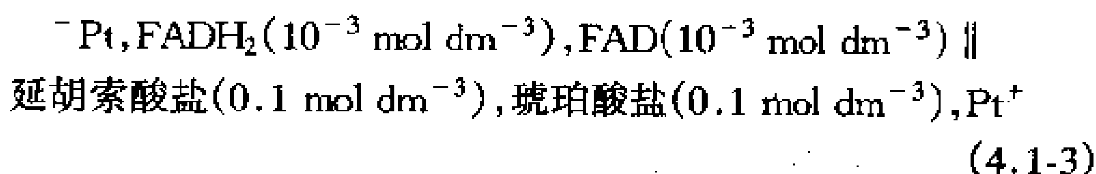
假使具有不同还原电极电位的半电池以适当方法连接而形成一电化学电池，还原电极电位值较大的是氧化性半电池，会发生还原反应，而还原电极电位较小的(正值较小或其值越负)是还原性半电池，会发生释放电子作电功的氧化反应。

任何半电池的还原电极电位大小除了取决于它的化学组分之外，还与溶液中那些组分的浓度(严格地说是指活度)和温度有关。于是习惯上常用电池简图来概括半电池如何组成电池及其组分间的氧化还原反应，并表达电子由左半电池向右半电池的流向。例如下列的氧化还原反应：



$$延胡索酸盐 + FADH_2 \rightleftharpoons 琥珀酸盐 + FAD$$

可分解为两个具有还原电极电位的半电池(即两对氧化还原电偶)。一对是延胡索酸盐(0.1 mol dm^{-3})/琥珀酸盐(0.1 mol dm^{-3})，$\varphi_{右电偶} = 0.03$V，另一对是 FAD(10^{-3}mol dm^{-3})/$FADH_2$(10^{-3} mol dm^{-3})，$\varphi_{左电偶} = -0.22$V，两半电池各加 Pt 电极和盐桥(以两直线 ‖ 表示)，则其简图为



$$^{-}Pt, FADH_2(10^{-3}\ mol\ dm^{-3}), FAD(10^{-3}\ mol\ dm^{-3}) \parallel$$
$$延胡索酸盐(0.1\ mol\ dm^{-3}), 琥珀酸盐(0.1\ mol\ dm^{-3}), Pt^{+} \qquad (4.1\text{-}3)$$

该电池的电位差是

$$\Delta\varphi=\varphi_{右}-\varphi_{左}=+0.25V$$

电极分别标明正负符号(即+和-接头)以强调电子自发流动的方向。电位差若是正值,表明电池简图符合习惯上的书写;如果电位差是负值,说明简图画反了。电化学电池的最大电位差(即通过电池的电流为零时所测得的可逆放电过程电位差之极限值)称为此电池的电动势(e.m.f),通常,电动势的 $\Delta\varphi$ 用 E 表示,以伏特(V)为单位,可参见热力学可逆过程中的电池电动势与 ΔG 的关系式(1.3-5b),即

$$\Delta G=-nFE$$

和标准态下的(2.2-10)式,即

$$\Delta G^{\ominus}=-nFE^{\ominus}$$

式中 $E^{\ominus}=\varphi^{\ominus}_{右}-\varphi^{\ominus}_{左}$,也就是右边半电池的标准态下还原电极电位 $\varphi^{\ominus}_{右ox/red}$减去左边半电池的标准态下还原电极电位 $\varphi^{\ominus}_{左ox/red}$。

4.1.2 电池电动势与电极电位测量

一个电化学电池未产生电流时所呈现的两半电池电位差才是该电池的真实电动势(e.m.f),如果产生了电流,电池中的氧化剂和还原剂等物质就以热力学不可逆过程进行了电子转移反应,从而使其浓度发生了变化,此时所测得的两半电池的电位差势必小于电池的电动势,电流释放越多,不可逆程度就越大,于是所测得的电位差就更小于电动势,所以不可用伏特计直接测量。因此必须采用poggendorff 对消法,将测定电动势的外电路上加一个方向相反而电动势可调相同的工作电池及其系统,以对抗原电池的电动势,可参见图 4-2。工作电池(E_w)接AB 均匀的电阻线(作电位计用),又用双臂电键(D)与待测电池

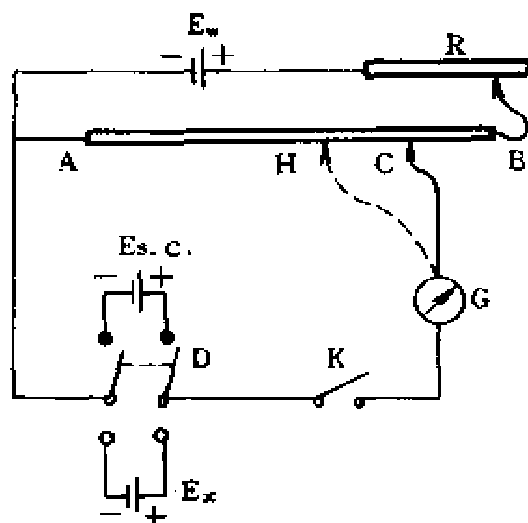


图 4-2 对消法测电动势示意

(E_x)以负极对负极并联，正极经检流计(G)与电键(K)接至电位计的滑动接头上。这就等于在电池的外电路上加了一方向相反的电位差，它的大小由滑动点的位置来决定。移动滑动点的位置就会找到某一点(例如C点)，当电键闭合时，检流计中没有电流通过。此时待测电池的电动势恰好和电位计AB上的AC线段所代表之电位差值相等，但方向相反。

若要确定AC线段的电位差值，只要将双键D向上接通标准电池$E_{s.c.}$，常用的标准电池是由镉-汞组成的Weston电池，电动势很稳定，电池内的反应是完全可逆的，其电动势值已知，即

$$E_{s.c.}=1.018646-[40.6(t-20)+0.95(t-20)^2-0.01/(t-20)^3]\times10^{-6}\text{伏} \quad (4.1\text{-}4)$$

式中　t ——代表摄氏温度。

以同样方法找出一点H，使电流计中没有电流通过，此时AH线段的电位差即等于$E_{s.c.}$，待测电池的电动势E_x可通过比例关系算得：

$$E_x=E_{s.c.}\frac{AC}{AH} \quad (4.1\text{-}5)$$

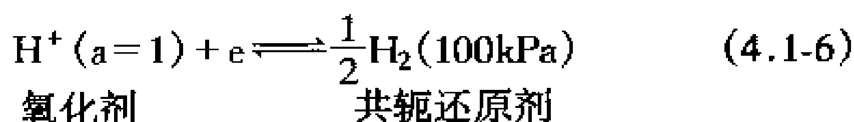
使用电位计时，可先将双键接通标准电池，移动可变电阻R的滑动点，以便标定电位计上的指示数值恰好等于$E_{s.c.}$，然后再将双键转接待测电池，调节电位计旋钮，即可从电位计上的数字读出电动势E_x之值。

由此测得的电化学电池的电动势，表示一个半电池与另一个半电池间电极电位差的大小，无法测定单独的一个半电池的电极电位实际数值。各种半电池的电极电位值只能从它们彼此对比来进行估算，这就需要有一标度零点来定出各半电池电极电位的相对值，该标度称氢标度，即采用标准氢半电池的电极电位作为标度零点，换言之，就是规定标准氢的$\varphi_{S.H.E}$(或$\varphi^{\ominus}_{H^+/H_2}$)=0.00V。

倘若一个半电池中的反应比标准氢半电池的更具有还原性时，这半电池对比标准氢半电池，即有负的电极电位；反之，一个半电池中的反应比标准氢半电池的更具有氧化性时，该半电池对比标准氢

半电池就有正的电极电位。

所谓标准氢电极，即溶液中含有活度等于1的H^+离子，在100kPa(旧用1标准大气压)下不断地通入氢气，并被插入溶液的铂箔表面镀有铂黑的铂电极所饱和吸附，以保证溶液中H^+离子与H_2气的变化平衡，也就是



$$H^+(a=1)+e \rightleftharpoons \frac{1}{2}H_2(100kPa) \qquad (4.1\text{-}6)$$

氧化剂　　　　　　共轭还原剂

半电池。pH为0的HCl溶液可为标准氢电极提供活度为1的H^+溶液。

任何半电池与标准氢电极组成的电池可以写为



$$Pt, H_2(100kPa), H^+(a=1) \parallel [ox],[red], Pt \qquad (4.1\text{-}7)$$

如果电池的电动势为负值，表明电流反向了，就应将组成电池的电极左右对换。按照上述对消法测定任何半电池与标准氢电极组成的电池电动势时，由于标准氢电极电位$\varphi^{\ominus}_{H^+/H_2}$规定为零，则其电池的电动势就为该半电池的电极电位$\varphi_x$值。如果

$$E=\varphi_x-\varphi^{\ominus}_{H^+/H_2}，则\ \varphi_x=E \qquad (4.1\text{-}8)$$

倘若

$$E=\varphi^{\ominus}_{H^+/H_2}-\varphi_x，则\ \varphi_x=-E \qquad (4.1\text{-}9)$$

虽然国际上都采用标准氢电极的氢标度，但制作标准氢电极的半电池需要精细技巧，使用时的条件亦十分严格，所以在实际测定时，往往采用第二级的标准电极。其中最常用的是二级标准甘汞电极，它在氢标度上所测定的$\varphi_{甘汞}$在很大温度范围内是已知的，例如

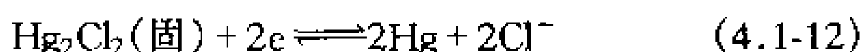
$$\varphi_{饱和甘汞}=0.2412-6.61\times10^{-4}(t-25)-1.75\times10^{-6}(t-25)^2$$
$$-9.16\times10^{-10}(t-25)^3 \qquad (4.1\text{-}10)$$

标准甘汞电极的构造是以汞(液)作电极材料，汞与导线之间用Pt丝接通，汞面上铺入少量由氯化亚汞(甘汞)、汞及饱和KCl溶液研制成的糊状物，浸在饱和的氯化钾水溶液中，即



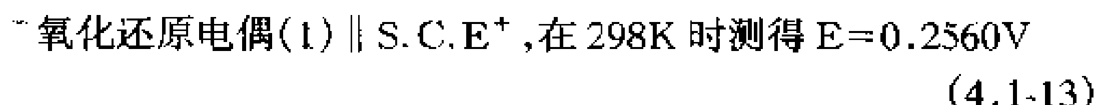
$$KCl(饱和), Hg_2Cl_2(固体) | Hg \qquad (4.1\text{-}11)$$

该半电池(常用S.C.E表示)的一对氧化还原电偶为



$$Hg_2Cl_2(\text{固}) + 2e \rightleftharpoons 2Hg + 2Cl^- \tag{4.1-12}$$

其还原电极电位($\varphi_{S.C.E}$)在 298K 时为 0.2412V(氢标度)。它同样可以代替标准氢电极与其它任何半电池联接而测定半电池的电极电位,例如



$^-$氧化还原电偶(1) ‖ S.C.E$^+$,在 298K 时测得 E=0.2560V　　(4.1-13)

则氧化还原电偶(1)的半电池之还原电极电位为

$$\varphi_{(1)} = \varphi_{S.C.E} - E = 0.2412 - 0.2560 = -0.0148V$$



又如　　$^-$S.C.E ‖ 氧化还原电偶(2)$^+$　　(4.1-14)

在 298K 时测得 E=0.1655V,则氧化还原电偶(2)的半电池之还原电极电位是

$$\varphi_{(2)} = E + \varphi_{S.C.E} = 0.1655 + 0.2412 = 0.4067V$$

4.1.3　有关电极电位和电池电动势的计算公式

在任何氧化还原反应中,转移 1 摩尔电子(即 6.022×10^{23}电子)所带的电量是 96485 库伦,此值为法拉第常数(符号为 F,常作为电量单位)。组成电池后两对氧化还原电偶的电极电位与吉布斯自由能关系为



$$^-Pt, red_{左}, ox_{左} \parallel ox_{右}, red_{右}, Pt^+ \tag{4.1-3}$$

$$-\Delta G = nFE \tag{1.3-5b}$$



$$\left.\begin{aligned} ox_{右} + ne &\rightleftharpoons red_{右} \qquad \varphi_{右} \\ ox_{左} + ne &\rightleftharpoons red_{左} \qquad \varphi_{左} \end{aligned}\right\} \tag{4.1-15}$$

$$-\Delta G = nF(\varphi_{右} - \varphi_{左}) \tag{4.1-16}$$

式中　ox ——代表氧化型,是电子受体;

　　red——代表还原型,是电子供体。

按照(2.2-11)电动势公式

$$E = E^{\ominus} - \frac{RT}{nF}\ln\frac{a_{ox_{左}}a_{red_{右}}}{a_{red_{左}}a_{ox_{右}}}$$

电极电位差的公式为

$$\varphi_{右}-\varphi_{左}=\varphi_{右}^{\ominus}-\varphi_{左}^{\ominus}-\frac{RT}{nF}\ln\frac{a_{red_{右}}}{a_{ox_{右}}}+\frac{RT}{nF}\ln\frac{a_{red_{左}}}{a_{ox_{左}}}$$

$$=\varphi_{右}^{\ominus}-\frac{RT}{nF}\ln\frac{a_{red_{右}}}{a_{ox_{右}}}-\left(\varphi_{左}^{\ominus}-\frac{RT}{nF}\ln\frac{a_{red_{左}}}{a_{ox_{左}}}\right) \quad (4.1\text{-}17)$$

即还原电极电位公式

$$\varphi_{右}=\varphi_{右}^{\ominus}-\frac{RT}{nF}\ln\frac{a_{red_{右}}}{a_{ox_{右}}} \quad (4.1\text{-}18)$$

$$\varphi_{左}=\varphi_{左}^{\ominus}-\frac{RT}{nF}\ln\frac{a_{red_{左}}}{a_{ox_{左}}} \quad (4.1\text{-}19)$$

式中　$\varphi^{\ominus}$——代表标准态下的电极电位，单位是伏(V)。

当等号右边第二项以 ox ⟶ red 还原形式书写氧化还原电偶，并采用减号时，$\varphi^{\ominus}$ 称标准还原电极电位。它是氧化还原电偶的特征参数，代表该氧化还原电偶提供电子的难易程度。

在水溶液中各种氧化还原电偶的标准还原电极电位可见表 4-1。所谓标准电极电位 $\varphi^{\ominus}$，它系指在恒温（如果不注明温度即为 298K）和标准大气压（100kPa）下氧化还原电偶的各组分都处于标准状态（对溶质来说活度为 1，pH＝0）时，按氢标度测定所得的电极电位。

倘若在标准大气压下，pH＝0 而其它溶质为 1mol dm^{-3}浓度时，即

$$E_c=E_C^{\ominus}-\frac{RT}{nF}\ln\frac{C_{ox_{左}}C_{red_{右}}}{C_{red_{左}}C_{ox_{右}}} \quad (4.1\text{-}20)$$

$$\varphi_{c右}=\varphi_{c右}^{\ominus}-\frac{RT}{nF}\ln\frac{C_{red_{右}}}{C_{ox_{右}}} \quad (4.1\text{-}21a)$$

$$\varphi_{c左}=\varphi_{c左}^{\ominus}-\frac{RT}{nF}\ln\frac{C_{red_{左}}}{C_{ox_{左}}} \quad (4.1\text{-}21b)$$

往往也被称为标准(态)还原电极电位，其实只有在溶质活度系数为

1 的理想溶液(各组分活度系数等于 1)情况下方可 $E_C^{\ominus} = E^{\ominus}$，$\varphi_{C右}^{\ominus} = \varphi_{右}^{\ominus}$，$\varphi_{C左}^{\ominus} = \varphi_{左}^{\ominus}$。

在生物细胞内的氧化还原反应，一般是在体温和近于中性(pH=7)的有水环境下进行的，对其所测得的还原电极电位，通常 pH 并非零而是 7(其它组分仍用活度为 1 标准态)，故其电池的标准电动势和各标准还原电极电位分别用 $E^{\ominus'}$ 和 $\varphi^{\ominus'}$ 表示，以显出与真实标准电动势和标准电极电位的区别。若干氧化还原半电池 $\varphi^{\ominus'}$ 的数据列于表 4-2。

表 4-1　298K 时标准(还原)电极电位

电极	电极反应	$\varphi^{\ominus}$(伏)	$(\frac{d\varphi^{\ominus}}{dT}) \times 10^3$ (伏×度$^{-1}$)
$Cr^{3+}, Cr^{2+}/Pt$	$Cr^{3+} + e \rightleftharpoons Cr^{2+}$	−0.408	
$D^+/D_2, Pt$	$D^+ + e \rightleftharpoons \frac{1}{2}D_2$	−0.0034	
$H^+/H_2, Pt$	$H^+ + e \rightleftharpoons \frac{1}{2}H_2$	±0.000	+0.000
$Cu^{2+}, Cu/Pt$	$Cu^{2+} + e \rightleftharpoons Cu^+$	+0.153	+0.073
$OH^-/O_2, Pt$	$\frac{1}{2}O_2 + H_2O + 2e \rightleftharpoons 2OH^-$	+0.401	−0.44
$Fe^{3+}, Fe^{2+}/Pt$	$Fe^{3+} + e \rightleftharpoons Fe^{2+}$	+0.771	+1.188
$I^-/I_2, Pt$	$I_2 + 2e \rightleftharpoons 2I^-$	+0.5355	−0.148
$H^+, IO_3^-/I_2, Pt$	$IO_3^- + 6H^+ + 5e \rightleftharpoons \frac{1}{2}I_2 + 3H_2O$	+1.195	
H^+,醌,对苯二酚/Pt	$C_6H_4O_2 + 2H^+ + 2e \rightarrow C_6H_4(OH)_2$	+0.699	

表 4-2 若干物质的还原电极电位

电极反应	$\varphi^{\ominus'}$(pH=7,30℃)
$\frac{1}{2}O_2+2H^++2e \rightleftharpoons H_2O$	+0.816
$Fe^{3+}+e \rightleftharpoons Fe^{2+}$	+0.771
细胞色素 $a_3Fe^{3+}+e \rightleftharpoons$ 细胞色素 a_3Fe^{2+}	+0.39
细胞色素 $aFe^{3+}+e \rightleftharpoons$ 细胞色素 aFe^{2+}	+0.29
细胞色素 $CFe^{3+}+e \rightleftharpoons$ 细胞色素 CFe^{2+}	+0.25
细胞色素 $C_1Fe^{3+}+e \rightleftharpoons$ 细胞色素 C_1Fe^{2+}	+0.22
辅酶 Q(泛醌)$+2H^++2e \rightleftharpoons$ 辅酶 QH_2(泛醇)	+0.10
细胞色素 $bFe^{3+}+e \rightleftharpoons$ 细胞色素 bFe^{2+}	+0.05
延胡索酸$+2H^++2e \rightleftharpoons$琥珀酸	+0.031
$FMN+2H^++2e \rightleftharpoons FMNH_2$	−0.03
$FAD+2H^++2e \rightleftharpoons FADH_2$	−0.06
草酰乙酸$+2H^++2e \rightleftharpoons$苹果酸	−0.166
丙酮酸$+2H^++2e \rightleftharpoons$乳酸	−0.190
乙醛$+2H^++2e \rightleftharpoons$乙醇	−0.197
1,3-二磷酸甘油酸$+2H^++2e \rightleftharpoons$3-磷酸甘油醛+磷酸	−0.290
$NAD^++2H^++2e \rightleftharpoons NADH+H^+$	−0.320
$NADP^++2H^++2e \rightleftharpoons NADPH+H^+$	−0.324
$H^++e \rightleftharpoons \frac{1}{2}H_2$	−0.420
铁氧还蛋白 $Fe^{3+}+e \rightleftharpoons$ 铁氧还蛋白 Fe^{2+}	−0.30～−0.49
3-磷酸甘油酸$+2H^++2e^- \rightarrow$3-磷酸甘油醛$+H_2O$	−0.55
乙酸$+2H^++2e \rightleftharpoons$乙醛$+H_2O$	−0.60
乙酸$+CO_2+2H^++2e \rightarrow$丙酮酸$+H_2O$	−0.70
琥珀酸$+CO_2+2H^++2e \rightarrow \alpha$-酮戊二酸$+H_2O$	−0.67
α-酮戊二酸$+CO_2+2H^++2e \rightarrow$异柠檬酸	−0.38

有的参考书采用了氧化电位数据，则其氧化电极电位的形式应写成

$$\varphi=\varphi^{\ominus}-\frac{RT}{nF}\ln\frac{a_{ox}}{a_{red}} \tag{4.1-22a}$$

或

$$\varphi=\varphi^{\ominus}+\frac{RT}{nF}\ln\frac{a_{red}}{a_{ox}} \tag{4.1-22b}$$

所以务必识别还原电极电位方程与氧化电极电位方程的表达形式，以避免用错公式和数据。

对电池电动势的近似计算中，往往采用标准还原电极电位 $\varphi^{\ominus}$ 数据和溶液中各溶质的量浓度 $C(mol\times dm^{-3})$，即

$$E=(\varphi_{右}^{\ominus}-\varphi_{左}^{\ominus})-\frac{RT}{nF}\ln\frac{C_{ox_{左}}C_{red_{右}}}{C_{red_{左}}C_{ox_{右}}} \tag{4.1-23}$$

从(2.2-10,12)公式 $\Delta G^{\ominus}=-nFE^{\ominus}$，$-nFE^{\ominus}=-RT\ln K_{eq}$，或 $E^{\ominus}=\frac{RT}{nF}\ln K_{eq}$，同样也可以得到 pH=7 时之 $\Delta G^{\ominus}=-nFE^{\ominus}$ 和 $E^{\ominus'}=\frac{RT}{nF}\ln K'_{eq}$。应用上述公式，又可以从测定的 $E^{\ominus'}$ 或已知的半电池 $\varphi^{\ominus'}$ 求得的 $E^{\ominus'}$ 来计算该反应的平衡常数 K'_{eq}。

例如：298K 和 pH=7 时，由



苹果酸盐 $+ NAD^{+} \rightleftharpoons$ 草酰乙酸盐$^{2-}$ $+ NADH + H^{+}$

反应所组成的两个半电池之还原电极电位分别为：$NAD^{+}/NADH+H^{+}$ 氧化还原电偶的 $\varphi^{\ominus'}$ 是 $-0.32V$；草酰乙酸盐$^{2-}$/苹果酸盐$^{2-}$ 氧化还原电偶的 $\varphi^{\ominus'}$ 是 $-0.166V$。按照这些数据，即可计算在此反应条件下的平衡常数 K'_{eq}。由于 $NAD^{+}/NADH+H^{+}$ 氧化还原电偶在此反应中是氧化电偶，则其半电池应具有 $\varphi_{右}^{\ominus'}$，而草酰乙酸盐$^{2-}$/苹果酸盐$^{2-}$ 在氧化还原电偶中是还原电偶，故在电池中有 $\varphi_{左}^{\ominus'}$。于是

$$E^{\ominus'}=\varphi_{右}^{\ominus'}-\varphi_{左}^{\ominus'}=-0.320-(-0.166)=-0.154V$$

$$\log K'_{eq} = \frac{nFE^{\ominus'}}{2.303RT} = \frac{2\times96487\times(-0.154)}{8.314\times298} = -5.21$$

$$K'_{eq} \approx 6.17\times10^{-6}$$

倘若 NAD^+ 在溶液中的还原型为 90%，即可计算



$$NAD^+ + 2H^+ + 2e \xrightleftharpoons[pH=7]{298K} NADH + H^+$$

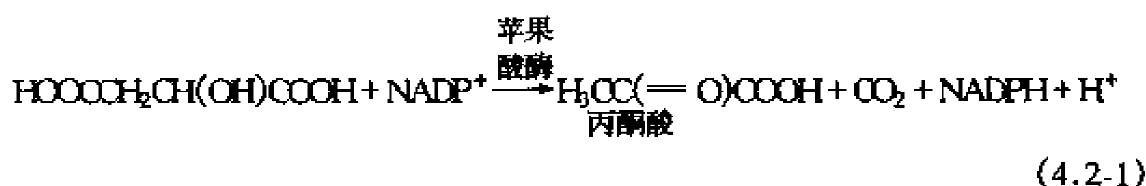
的氧化还原电偶之还原电极电位：

$$\varphi'_{NAD^+/NADH} = \varphi^{\ominus'} - \frac{2.303RT}{nF}\log\frac{[red]}{[ox]} = -0.32 - \frac{0.059}{2}\log\frac{C\times90\%}{C\times10\%}$$

$$= -0.32 - 0.0282 = -0.348V$$

4.2 生物氧化

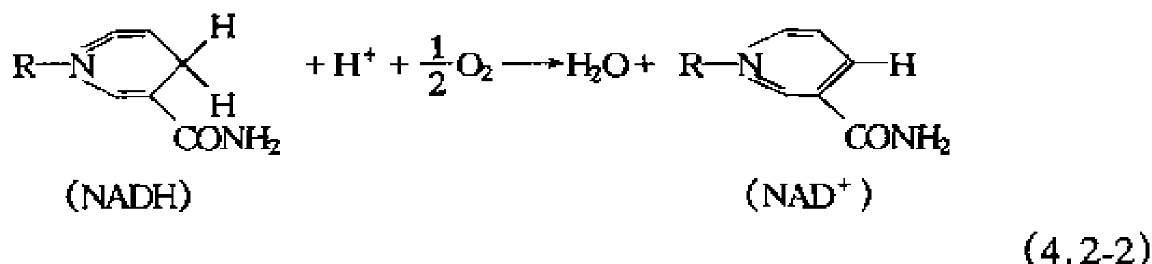
通常，在体温和近于 pH = 7 中性的水溶液条件下，细胞生物氧化是在一系列酶、辅酶和中间传递体的作用下分步进行的。在真核细胞内的生物氧化一般是在线粒体内进行，而不含线粒体的原核生物如细菌细胞内，生物氧化通常是在细胞膜上进行，氧化产物往往含有 CO_2 或 H_2O，例如：



$$HOOCCH_2CH(OH)COOH + NADP^+ \xrightarrow{\text{苹果酸酶}} H_3CC(=O)COOH + CO_2 + NADPH + H^+$$

丙酮酸

(4.2-1)



(4.2-2)

4.2.1 呼吸链

生物体内代谢物的种类繁多，它们的氧化过程也不尽相同，代谢物上的氢原子被脱氢酶激活脱落后，经一系列的传递体，最后传递给

被激活的氧分子而生成水的全部过程，称为呼吸链。通常，此过程也称电子传递体系或电子传递链。

参加呼吸链的氧化还原酶有：烟酰胺脱氢酶类、黄素脱氢酶类、铁硫蛋白类、细胞色素类、辅酶 Q 等。

作为呼吸链中传递体的有多种，有的是传氢体，如脱氢辅酶Ⅰ烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD^+）和Ⅱ烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（$NADP^+$）、黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）、黄素单核苷酸（FMN）、辅酶 Q（C_oQ）等；有的是传电子体，如细胞色素酶系 b、c_1、c、a、a_3 等；典型的呼吸链有含 NADH 传递体或 $FADH_2$ 传递体的两种，它们是以代谢物脱氢的初始受体之不同而区分的，见图 4-3。

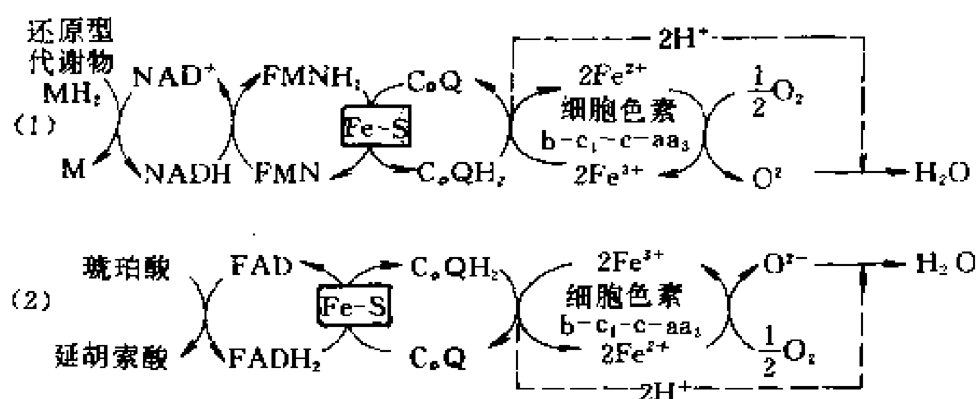


图 4-3　以代谢物脱氢的初始受体 NAD^+ 与 FAD 区分的呼吸链图解

糖、脂肪、蛋白质三大物质分解代谢中脱氢的氧化反应，绝大部分是由呼吸链完成的，所以生物界认为 NADH 呼吸链是最广泛的生物氧化过程。以 NAD^+ 或 $NADP^+$ 为辅酶的烟酰胺脱氢酶类等，目前已知者达 200 多种。在 FAD 呼吸链中的黄素脱氢酶只能催化某些代谢物脱氢。

当烟酰胺脱氢酶催化还原型代谢物脱氢时，其辅酶 NAD^+ 或 $NADP^+$ 首先和酶的活性中心结合，再与代谢物脱下的氢结合而还原成 NADH 或 NADPH，若有 H 受体存在，NADH 上的 H 又可被脱下而氧化成 NAD^+ 或 $NADP^+$，即

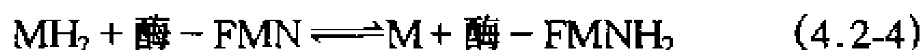


$$NAD^+ + 2H(2H^+ + 2e) \rightleftharpoons NADH + H^+ \qquad \varphi^{\ominus'} = -0.32V \tag{4.2-3a}$$

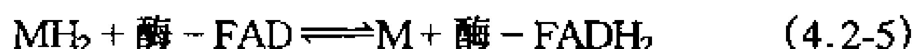


$$NADP^+ + 2H(2H^+ + 2e) \rightleftharpoons NADPH + H^+ \qquad \varphi^{\ominus'} = -0.324V \tag{4.2-3b}$$

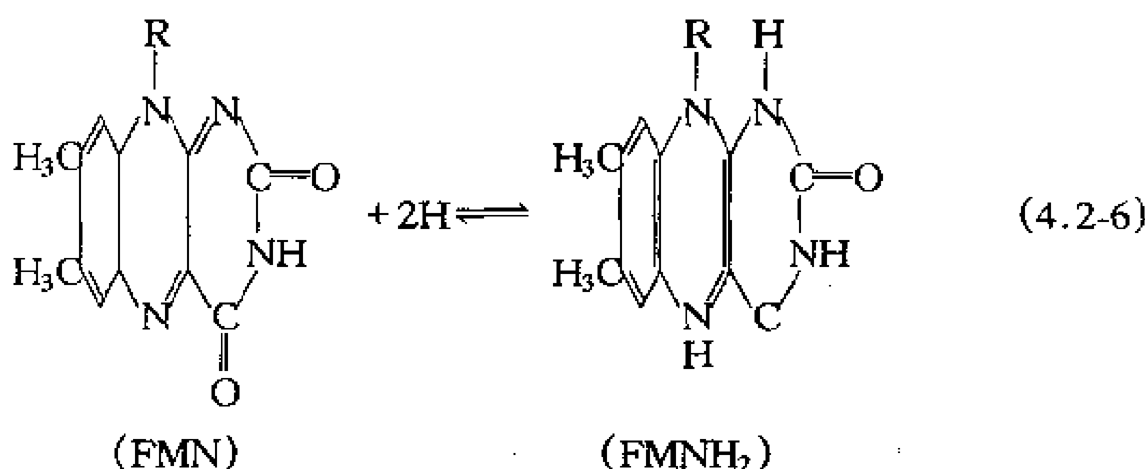
黄素脱氢酶类是以黄素单核苷酸(FMN)或黄素腺嘌呤二核苷酸FAD作为辅基,接受电子传递的都是核黄素的异咯嗪环。FMN或FAD与酶蛋白结合,酶催化代谢物MH_2脱氢,将一对氢原子直接传递给FMN或FAD的异咯嗪基而形成$FMNH_2$或$FADH_2$,它们进行电子转移反应后并未离开酶的表面,即



$$MH_2 + 酶 - FMN \rightleftharpoons M + 酶 - FMNH_2 \tag{4.2-4}$$



$$MH_2 + 酶 - FAD \rightleftharpoons M + 酶 - FADH_2 \tag{4.2-5}$$



这类酶除了需有黄素核苷酸之外,还务必有Fe、M_o等金属离子方能呈现催化活性。

铁硫蛋白类(Fe-S)的分子中含有非卟啉铁和对酸不稳定的硫,其活性部位含有两个活泼的无机硫与两个铁原子所形成的铁硫中心,它的作用是以铁的互相变价来传递电子,即

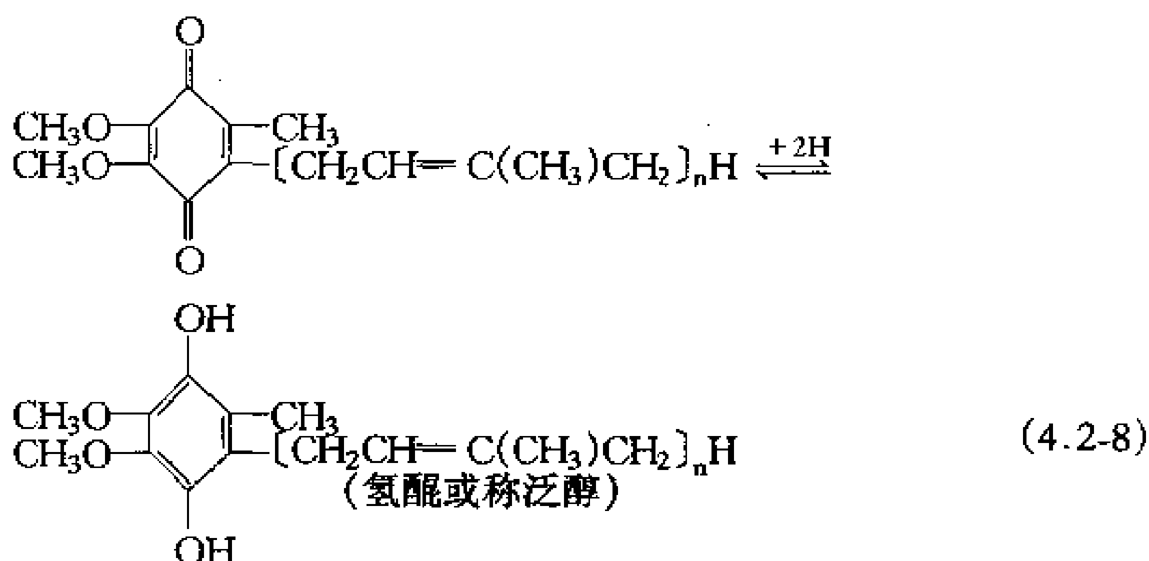


$$Fe^{3+} + e \rightleftharpoons Fe^{2+} \tag{4.2-7}$$

在微生物、动物组织中皆有铁硫蛋白,常在线粒体内膜上与黄素类酶或细胞色素结合而成复合物。在NADH呼吸链中有多个不同的铁硫中心,有的是在NADH脱氢酶中,有的是与细胞色素b及C_1有

关。了解最清楚的是细菌和叶绿素中的铁氧化还原蛋白，通常含有等摩尔量的铁硫（Fe_2S_2 或 Fe_4S_4）。铁硫蛋白参与叶绿素光合作用过程中的电子传递。

辅酶 Q 类是一种脂溶性的醌类化合物，又称泛醌，广泛存在于生物界，其分子中的苯醌结构既能可逆地加氢还原，也可去氢氧化；与其对应物是对苯二酚衍生物，但它不能从底物接受氢，仅是一种中间传氢体，电子传递链上唯一的非蛋白质组分，即



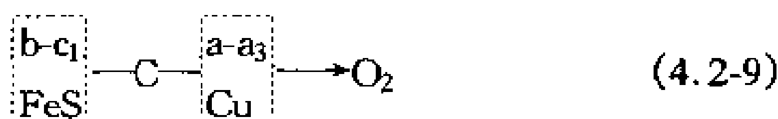
(4.2-8)

分子侧链上异戊二烯的 n 值在 6～10 之间，n＝10 的 Q 是哺乳动物线粒体电子传递体的最通常形式，不同来源的辅酶 Q，其侧链长度是不同的。它在呼吸链中的传氢顺序，究竟是在细胞色素 b 之前还是 b 和 c_1 之间，具有机动性。辅酶 Q 是整个传递链上唯一没有紧密地与蛋白质结合的传递体，它可在黄素蛋白和细胞色素 c 之间作为流动的电子传递体，起着战略作用。辅酶 Q 在植物光合作用的电子传递中，也起着重要作用。

细胞色素（Cyt）类是一类以铁卟啉为辅基的蛋白质，在呼吸链中以铁化合价的可逆变化（$Fe^{3+}+e \rightleftharpoons Fe^{2+}$）来传递电子。目前发现的细胞色素有多种，如 a、$a_3$、b、c、$c_1$ 等。现在还不能将 a 与 a_3 分离，则将 aa_3 合称为细胞色素 c 氧化酶，它以复合物形式存在于传递体的末端。不同种类的细胞色素的辅基结构及其与蛋白质联结的方式

是不同的，其中细胞色素 b、c_1、a、a_3 具有疏水性，它们与线粒体内膜紧密地结合在一起，成为膜组成的蛋白，而细胞色素 c(Cytc)可见图 4-4，能溶于水，成为膜周围蛋白。

Cyt aa_3 分子中除了含铁卟啉之外，尚有 $Cu^{2+} + e \rightleftharpoons Cu^{+}$ 可变价的铜原子，以其化合价变化，将电子从 a_3 传到氧上，故在细胞色素体系中也呈复合体的排列，在典型的线粒体呼吸链中，其排列是参见图 4-5 细胞色素顺序。



(4.2-9)

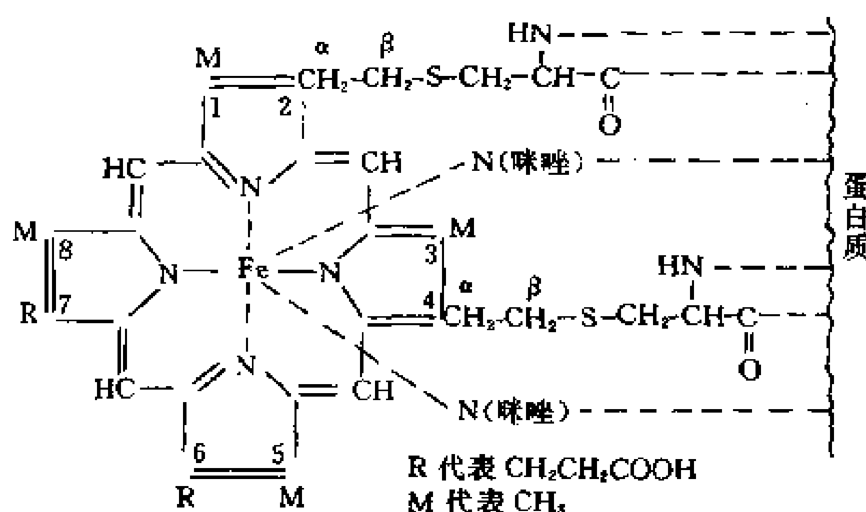


图 4-4 细胞色素 C(可溶性的小蛋白质，Mr = 13000)

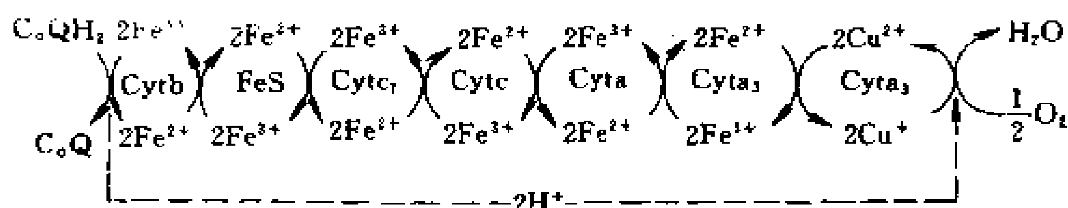


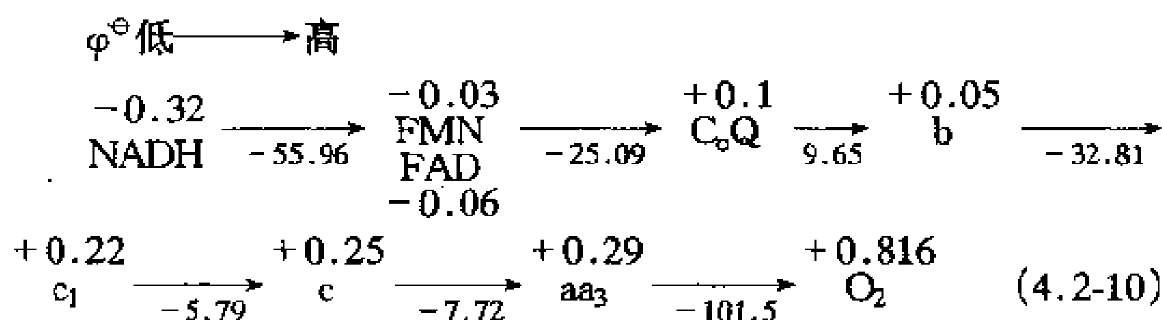
图 4-5 细胞色素(Cyt)顺序电子转移链

由图 4-5 可知，仅是最后一个 a_3 可被分子氧直接氧化。这是由

于 Cyt aa_3 中的铁原子形成了五个配位键，还保留一个配位键能与 O_2、CO、CN^- 等结合，在正常情况下具有与氧结合的功能所致。在其余的细胞色素中铁原子与卟啉环以及蛋白质形成六个共价键或配位键，所以不能再与 O_2、CO、CN^- 等结合。显然，Cyt aa_3 无疑应排在顺序的最后一位。

根据各种电子传递体标准还原电极电位 $\varphi^{\ominus'}$ 测定的数据，以及利用某种特异的抑制剂切断其中的电子流后，再测定电子传递链中的各传递体组分之氧化还原状态，又在体外将电子传递体重新组成呼吸链等实验而得的结果，认为呼吸链中氢和电子的传递是有着严格的顺序和方向性的。

各传递体组分在呼吸链上的位置顺序与其得失电子趋势的强弱有关，电子总是从低还原电极电位的半电池向高还原电极电位的半电池方向流动，还原电极电位 $\varphi^{\ominus'}$ 数值越低，供电子的倾向越大，越容易成为还原剂，势必要处于呼吸链顺序的前面。



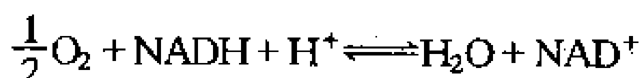
从 $\varphi^{\ominus'}$ 值而言，细胞色素 b 应在 C_oQ 之前，但其它实验却证明细胞色素 b 是位于 C_oQ 之后。上述箭号下的数据是按 $\Delta G^{\ominus'} = -nFE^{\ominus'}$ 和 $E^{\ominus'} = \varphi^{\ominus'}_{右} - \varphi^{\ominus'}_{左}$ 公式(其中 n=2)算得的两对氧化还原电偶的自由能变化值(千焦)。

4.2.2 电子传递体系磷酸化

从 NADH 或 $FADH_2$ 经电子传递体系将电子传递给氧形成水时，同时伴有 ADP 磷酸化为 ATP 的全过程，称为电子传递体系磷酸

化。电子传递体系磷酸化是随电子传递过程而进行生物体内能量转移的主要方式，这是电子传递过程和磷酸化反应偶联的结果。通常，偶联的磷酸化是指 ADP 与磷酸(Pi)生成 ATP 的反应。

现在已从实验弄清，自 NADH 到分子氧的呼吸链中，有三个氧化还原过程释放的能量会转化为磷酸键能的部位。根据各氧化还原电偶的还原电极电位及 $\Delta G^{\ominus'} = -nFE^{\ominus'}$ 公式的计算，对比每合成 1 摩尔 ATP 需要 30.54 千焦能量，可知由 NADH 呼吸链中的三个部位所释放的自由能超过此值。在整个呼吸链中：



$$\frac{1}{2}O_2 + NADH + H^+ \rightleftharpoons H_2O + NAD^+$$

$$E^{\ominus'} = 0.816 - (-0.32) = 1.136V$$

$\Delta G^{\ominus'} = -nFE^{\ominus'} = -2 \times 96485 \times 1.136 = -219.21$ 千焦/摩尔

三个部位：

(1)NADH ⟶ 细胞色素 b

$E^{\ominus'} = 0.05 - (-0.32) = 0.37V$，

$\Delta G^{\ominus'} = -2 \times 96485 \times 0.37 = -71.4$ 千焦/摩尔

(2)细胞色素 b ⟶ 细胞色素 c

$E^{\ominus'} = 0.25 - 0.05 = 0.20V$，

$\Delta G^{\ominus'} = -2 \times 96485 \times 0.20 = -38.6$ 千焦/摩尔。

(3)细胞色素 aa_3 ⟶ O_2

$E^{\ominus'} = 0.816 - 0.29 = 0.526V$，

$\Delta G^{\ominus'} = -2 \times 96485 \times 0.526 = -101.5$ 千焦/摩尔。

这三个部位所释放的自由能足以供给形成 ATP 所需的能量。通过测定线粒体或其制剂每消耗 1 摩尔氧原子(O)所消耗无机磷的量(摩尔，即P/O比值)来研究氧化磷酸化，这是最常用的方法，因为由此可以间接地得知 ATP 的生成量。实验表明，NADH 呼吸链的 P/

O 值是 3，也就是每消耗 1 摩尔氧原子能形成 3 摩尔 ATP。这与电化学实验所计算的结果推论相吻合，见图 4-6。

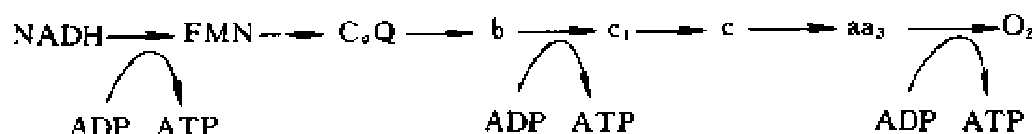


图 4-6 NADH 呼吸链电子传递体系磷酸化部位

$FADH_2$ 呼吸链的 P/O 值是 2，可以说明消耗 1 摩尔氧原子能形成 2 摩尔 ATP。

从不同底物所得的 P/O 值可能并不完全相同，但根据它参加呼吸链的 P/O 比值，可以推定氧化磷酸化部位。

以电子传递的生物氧化与氧化磷酸化或呼吸链都是在细胞线粒体内进行的，所以线粒体在细胞内犹如一供应电能和电讯号的微电池。

4.3 氧化磷酸化作用机理

在细胞浆中的 NADH 不能通过正常的线粒体内膜，即胞浆中进行糖酵解所产生的 NADH，若要进入线粒体内呼吸链氧化生成 ATP，务必经历较复杂的过程，目前所了解的仅是线粒体之外的 NADH 将其所带的 H 转交给某种能透过线粒体膜而担任穿梭任务的化合物，例如 α-磷酸甘油、苹果酸等。由它们进入线粒体内之后再进行氧化，即胞液中的 α-磷酸甘油脱氢酶可以促进磷酸二羟丙酮与 NADH 交换 H 而还原成 α-磷酸甘油，它能穿透到线粒体内，再由线粒体内另一种 α-磷酸甘油脱氢酶催化所进入的 α-磷酸甘油脱氢，形成 $FADH_2$ 和磷酸二羟丙酮，后者又能返回线粒体外，而线粒体内的 $FADH_2$ 通过呼吸链电子传递体系产生 ATP。

上述 ADP 磷酸化为 ATP 需在线粒体内进行，但 ADP 和 ATP

均不能自由地通过线粒体内膜，务必在内膜上的腺苷酸转位酶作用下方能定向地将胞浆中的ADP运入线粒体，又将ATP运出，这种定向交换转运有利于氧化磷酸化顺利地进行。磷酸化所需的无机磷酸(Pi)也必须在特异的磷酸转位酶作用下与OH^-（或苹果酸）交换转运入线粒体内。

氧化与磷酸化如何偶联，目前有一些偶联学说，其中得到较多支持者的是化学渗透学说，其主要内容是：

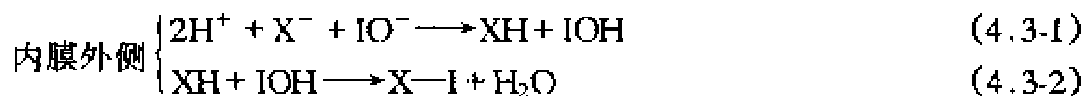
(1)在呼吸链中的传氢体与电子传递体是相间交替按顺序起作用的；

(2)在呼吸链中的催化反应是定向的，传氢体自线粒体内膜之内侧接受底物的氢(2H)，将电子转给其后的电子传递体，犹似氢泵作用而将$2H^+$泵出内膜；

(3)泵出膜外侧的H^+不能自由地通过内膜而返回内侧，致使内膜外侧的H^+离子浓度高于内侧(使pH差1个单位左右)，造成H^+离子浓度的跨膜梯度电位差，犹如电池两极离子浓度差所引起的电位差而含有电能一样，导致原有的外正内负的跨膜电位差增高；

(4)H^+浓差所含的能量可用于合成ATP(即$ADP + Pi \longrightarrow ATP + H_2O$)，其机理是假定内膜中有传递能量的中间物$X^-$和$IO^-$，在靠近内膜的外侧面能与泵出的$H^+$结合成酸式中间物XH和IOH，两者脱水而形成X-I，其结合键能含有来自H^+浓度差所引起的电位差之能量；

(5)X-I可扩散到膜的内侧面，在ATP合成酶的催化下将键间能量转移给ADP和Pi而促使合成ATP，又由于膜内侧H^+浓度较低，有利于X-I离解重新恢复碱式X^-和IO^-之存在，这样就使膜外侧的$2H^+$转化成膜内侧的$2H^+$，即



内膜外侧 $\begin{cases} 2H^+ + X^- + IO^- \longrightarrow XH + IOH & (4.3\text{-}1) \\ XH + IOH \longrightarrow X{-}I + H_2O & (4.3\text{-}2) \end{cases}$



内膜内侧 $X{-}I + ADP + Pi \xrightarrow{\text{ATP 合成酶}} ATP + X^- + IO^- + 2H^+ \quad (4.3\text{-}3)$

(6)膜内侧的$2H^+$能被下一个传氢体(例如FMN或C_oQ等)接

受，又进行上述电子和氢原子的转移反应，最后内侧的 $2H^+$ 被 O^{2-} 结合生成 H_2O，传氢体每接受 2H 和泵出 $2H^+$（2 摩尔）可产生 1 摩尔 ATP，NADH 呼吸链机理中所接受和泵出的 3 对氢原子，可以生成 3 摩尔 ATP。

化学渗透学说对电子传递顺序的设想与前述呼吸链不完全一致，即辅酶 Q 是列在细胞色素 b 和 c 之间。虽然对氧化磷酸化的作用机理给予一定的解释（见图 4-7），但有的仅停留于设想，尚待进一步研究。

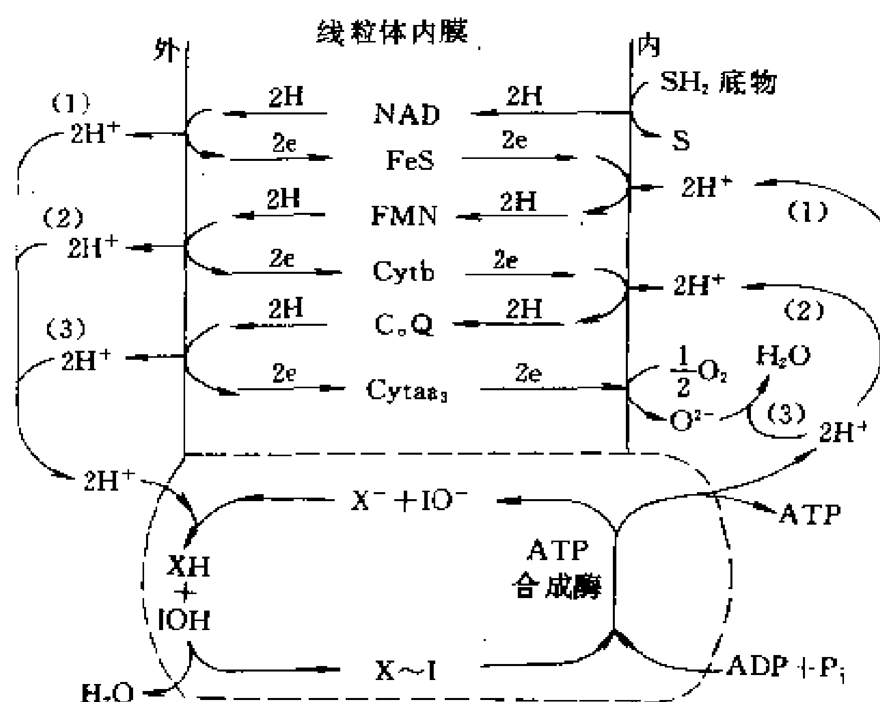
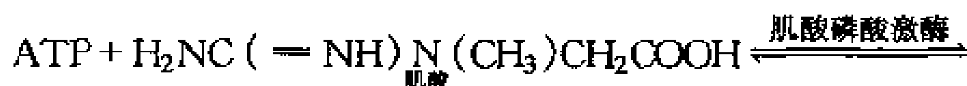


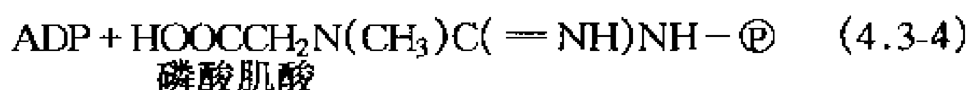
图 4-7　化学渗透学说示意图

(1)、(2)、(3)分别表示三次偶联磷酸化的氢离子传递

生物体内大多数的 ATP 是随着氧化磷酸化产生的，它也是一种中间能量传递体，例如 ATP 可以将磷酸键转给肌酸形成肌肉或脑组织能量贮存的磷酸肌酸，即



$$ATP + H_2NC(=NH)\underset{\text{肌酸}}{N}(CH_3)CH_2COOH \xrightleftharpoons{\text{肌酸磷酸激酶}}$$



另外,ATP 还可分别将磷酸键转移给 UDP、CDP、GDP 而依次生成用于多糖合成的 UTP、用于磷脂合成的 CTP 或用于蛋白质合成的 GTP 等。于是 ATP 具有的化学能可以转变为生物体内各种所需要的能量,如合成所需的化学能,生物电所需的电能等。

虽然以上独立地讨论了呼吸链的电子传递过程、氧化磷酸化作用,以及上几章中的糖酵解或脂肪酸的 β-氧化作用、三羧酸循环(TCA),但它们在生物机体中是连续而高度统一与相互关联地来完成的,因此能满足细胞对代谢和能量的需要。

总之,电子传递与磷酸化作用是紧密地相偶联的,即电子的转移导致 ATP 的生成,ATP 的合成推动着电子流动。在细胞中〔ATP〕/〔ADP〕的比例对调节呼吸器中的还原型辅酶之积累或消耗方面起着重要作用。在需要的 NADH 或其它电子源、氧、Pi 和 ADP 等中,由于前三者不易出现速率的限制浓度,所以调节氧化磷酸化作用速率的最重要物质是 ADP,ADP 的含量对于磷酸化作用在热力学和动力学上均有着紧密关系。当 ATP 用于细胞活动中而被消耗,则〔ATP〕降低而〔ADP〕升高,这就推进 ATP 的合成,激发电子加快传递,辅酶进行再循环,底物因而被氧化,同时氧被消耗。当 ATP 在细胞中积累时,ADP 浓度相应下降,电子传递减慢(或停止),辅酶处于还原型而不能用来作为电子受体,整个呼吸代谢就受到有效的抑制。这种调节电子传递链的活性是属氧化磷酸化速率的调节也称为呼吸调节。

4.4 P. Mitchell 的化学渗透偶联假说及其实验探讨

P. Mitchell 首先提出偶联的化学渗透模型,近来已获得大量的事实证明而得到越来越多的支持。他假设伴随着电子传递过程的氢

转移的传递体在线粒体内膜上是不对称地分布着，电子的传递过程总是伴有质子从线粒体里层产生向膜外迁移，形成质子在膜内外的跨膜浓度差，即跨膜 pH 梯度。电子传递与质子向量转移是相偶联的，在电子传递和质子转移过程中所引起的自由能变化可形成膜电化学电位，这种电位对合成 ATP 提供了驱动力，作为 ATP 合成的酶系统也以不对称的复合物被组织在内膜中。

在电子传递过程中，膜电位所引起的质子迁移力(pmf)也包含跨膜 pH 梯度的影响，这是由于总化学电位随跨膜质子浓度差而变化，并正比于质子迁移力(pmf)，以公式表达为

$$\Delta P = \Delta\psi - \frac{2.3RT}{F}\Delta pH \tag{4.4-1}$$

式中 ΔP——代表质子迁移力；

$\Delta\psi$——代表跨膜电位差；

F ——代表法拉第常数。

从实验发现，电子的传递可导致跨线粒体内膜 pH 梯度约 1.4 单位，形成的膜电位 ψ 约为 0.14V。电子在膜内传递的结果，也能建立跨细菌质膜的质子迁移力；在叶绿体的光合磷酸化作用过程中会产生跨叶绿体类囊体膜的质子迁移力。不过，类囊体膜里的 pH 比细胞质周围要低，此 pH 梯度方向正好与线粒体相反。线粒体内膜对质子的不通透性可以被某些物质如二硝基苯(DNP)破坏，使膜对质子具有通透性，以致具有 pmf 的系统因质子跨膜主动漏回而梯度消失，不能形成 pmf 也就不会生成 ATP，由此不仅证实氧化磷酸化作用中 pmf 的存在，而且显示了其重要性。

电子传递体是跨膜定向传递质子的主动传输体系，该体系的三个能量储存位置中之传递体必须不对称地排列在膜内。用各种技术(包括专一抗体、对糖蛋白中特定糖基有高亲和力的蛋白质凝集素等的结合，蛋白水解酶和不透过膜试剂来标记等等)，通过以完整线粒体和由超声波处理制得的内膜片段(亚线粒体微粒)重新构成的囊泡(膜内侧外翻，通常朝向线粒体基质的一侧表面转为朝外，一般朝向

胞质的一侧表面转为向内)进行对比研究,清楚地发现,每一个储存部位均不对称地排列而横跨膜内。例如细胞色素氧化酶复合物只在向胞质的表面结合细胞色素 c,在向基质的表面结合氧,并按一个方向传递质子。这些情况表明,传递体在膜中有特定的排列顺序。

A. Jagendorf 将叶绿体保持在 pH 4 液中数小时之后(类囊体内容物达到 pH 平衡),突然把叶绿体移入 pH 8 的缓冲溶液中,暂时诱发出跨类囊体膜的 pH 梯度,即类囊体盘外的基质 pH 远大于盘内,发现加入 ADP 和磷酸时,pH 梯度随 ATP 的突然合成而消失。同样结果在线粒体中也可观察到。这表明 pmf 是通过电子传递(氧化或光合引起)产生的,并促使了 ATP 的生成。所以,可以这样说:在线粒体中 ATP 的合成会伴有质子横跨内膜的向内运动,而叶绿体则是质子横跨类囊体膜向外流动。它不需要假设的可传递能量的化学上或构象上的中间物。

对一种嗜盐细菌中视紫红质(紫色膜部分的蛋白质)的研究,发现在有氧的条件下这种细菌可以通过氧化磷酸化作用合成 ATP。当缺氧时可利用光照射,细菌视紫红质起着从里面向细菌外面泵出质子,这样生成的 pmf 能在呼吸链的功能完全没有时促进生成 ATP。由此研究成果进一步了解到 pmf 是电子传递和合成 ATP 之间最可能的偶联枢纽。

用电子显微镜观察,已直接见到由 pmf 所驱动线粒体和叶绿体(以及细菌的质膜)的 ATP 生成酶系统犹似电子传递系那样定向地定位于膜中。在内膜特殊折叠造成的嵴(中间高起部位)上,有直径约 8.5nm 球状突出物,倚 5.0nm 长、3.0nm 宽的柄与内膜连接,它是膜 ATP 合成酶复合物的组成部分。现称偶联因子 F_1,是由五条不同多肽组成的聚合物,相对分子质量(旧称分子量)约为 36 万。若它从亚线粒体膜上脱落,脱落后的膜虽仍能进行电子传递,但不能再合成 ATP,将球状突出物 F_1 放回到脱落颗粒上时,ATP 合成的能力又被恢复。

线粒体 ATP 合成系统的另一主要成分称作 F_o,包埋在线粒体

膜内，与 F_1 由几个蛋白组成的柄连接一起。当跨膜 pmf 通过 F_1 来驱动 ATP 合成时，F_o 是质子流动的通道并控制着质子的流动和 ATP 的合成速度。

关于 pmf 驱动 ATP 合成的设想，现在还存在几个关键性问题：一则尚需探讨务必通过 F_o 通道从而引起磷酸化作用的质子数；另一是有关质子迁移时驱动 ATP 合成的机理，因为目前仍停留在猜测中。对于质子如何通过 F_o 通道的移动而放能驱动 ADP 通过 F_1 吸能产生磷酸化作用生成 ATP 的问题，Mitchell 又提出了质子流在 F_1 活性位置上的直接相互作用的看法；Boyer 提出是通过酶复合物的构象偶联传递的观点；Racker 也提出了在 pmf 作用下从 F_1 的 ATP 合成酶上置换 Mg^{2+} 的模型。

综上所述，pmf 很可能是 ATP 合成的驱动力，在大多数情况下，跨膜维持着一个稳态的 pmf，并从辅酶到氧逐个地连续不断地调节着电子的传递，致使向外泵出的质子和为了合成 ATP 的需要而向内的质子流按所需速度达到相互平衡。

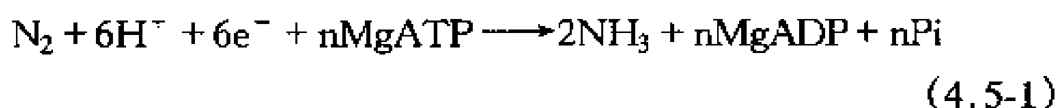
4.5 无机氮参与的电子转移体系

4.5.1 固氮电子传递体系

一些微生物所具有的固氮酶系可以将空气中吸附的氮分子离解活化，并与氧化脱氢酶-氢化酶系催化供氢体(例如丙酮酸)所提供的氢逐步合成氨。固氮酶系又是一个电子传递体系，它利用一系列氧化还原将电子逐步转移给氮原子。固氮酶的电子传递体系的作用见图 4-8。根据科学家们对固氮酶系电子传递的顺序构思，铁催化剂在工业生产中将 N_2 和 H_2 合成氨时的表面吸附活化氮，与氢逐步结合机理的分子水平研究成果，推定氢原子从供氢体上脱下时，将电子按铁氧还蛋白、铁蛋白、钼铁蛋白逐一传递给在钼铁蛋白上解离的氮原子，使其逐步带负电，随即与 H^+ 结合，经三步合成氨。

上述的固氮反应是氮的还原过程，该过程需要电子供体，当电子

从固氮酶中的铁蛋白传递给钼铁蛋白(电子供体)时,还需要 ATP 参与提供能量而活化电子与 N_2,其协同作用促使 N_2 分子解离成带负电的“氮离子”,从而与氢离子逐个结合成 NH_3,其总反应式为:



$$N_2 + 6H^+ + 6e^- + nMgATP \longrightarrow 2NH_3 + nMgADP + nPi \quad (4.5\text{-}1)$$

ATP 是以与 Mg^{2+} 生成络合物形式,在参与铁蛋白的电子传递中供应能量的,从另一角度而言,对于活化钼铁蛋白的催化作用有着重要贡献,导致氮原子越过势垒形成负离子,为合成氨作了有利的准备。

现在已发现不同的固氮微生物有不同之电子供体,固氮菌的电子传递体系比较复杂,有铁蛋白和黄素蛋白等参与。

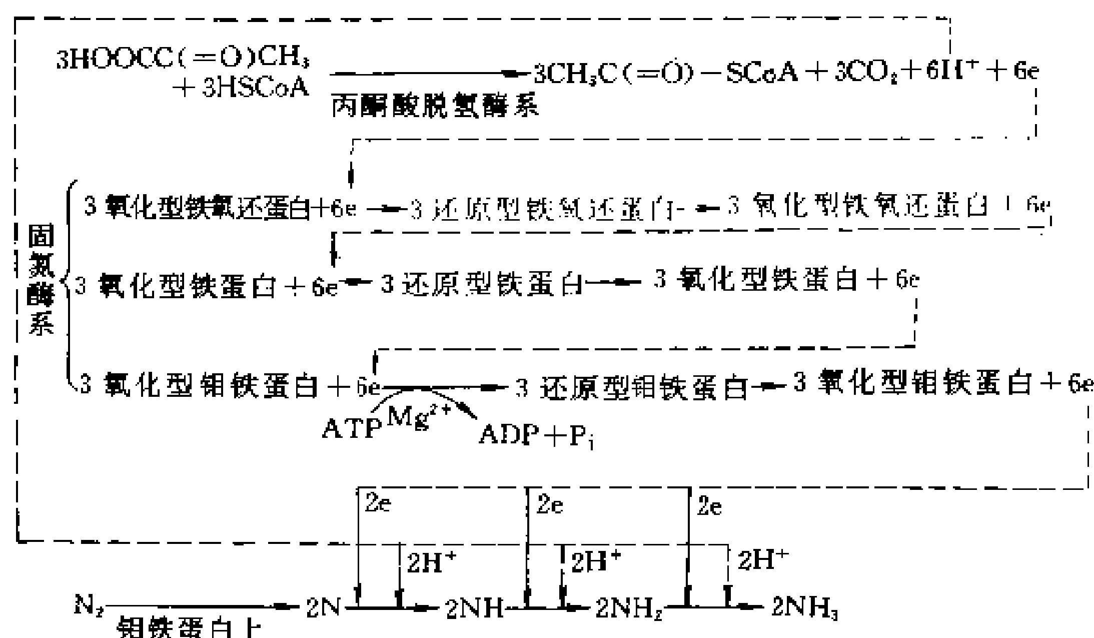


图 4-8 固氮酶系电子传递体系示意

4.5.2 氮的氧化物还原生成氨

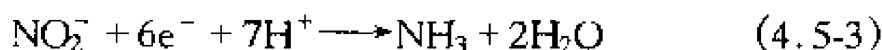
实验证明,植物与微生物可还原硝酸盐而使之转化为氨,通常,科学工作者认为该还原过程是经几个步骤完成的。硝酸盐还原成亚硝酸是由硝酸还原酶系催化进行的,此酶系含有钼与 FAD 辅酶,属于钼黄素蛋白一类。在该酶催化 NO_3^- 还原中,FAD 和 $M_o^{+5} \rightleftharpoons$

M_o^{+6} 起着电子传递体作用，而 $M_o^{+5} \rightleftharpoons M_o^{+6}$ 是催化活性中心，它把 2 个电子交给 NO_3^-，然而硝酸还原酶尚需 $2H^+$ 夺取 NO_3^- 上的 $O^=$ 而生成水，所以又需 NADH 为供氢体。NO_3^- 还原为 NO_2^- 的过程可参阅图 4-9 所示意。总的氧化还原反应式为：



$$NO_3^- + NADH + H^+ \longrightarrow NO_2^- + NAD^+ + H_2O \qquad (4.5\text{-}2)$$

关于亚硝酸盐还原为氨的过程，是由叶绿体中亚硝酸还原酶催化完成的，其氧化还原电子转移反应式为



$$NO_2^- + 6e^- + 7H^+ \longrightarrow NH_3 + 2H_2O \qquad (4.5\text{-}3)$$

式中 6 个电子来源于还原型铁氧还蛋白，但催化的中间过程还不很清楚，NO_2^- 如何被还原为正一价氮，又如何还原为负一价氮等两步骤尚未探讨清楚。根据氮的氧化物 NO 在亚硝酸还原酶的 M_o 或 Fe 上接受电子，推想可能有 NO^- 形态正一价氮和铁催化剂上有 NH 形态的负一价氮存在，可用图 4-10 表达氮的价数变化。

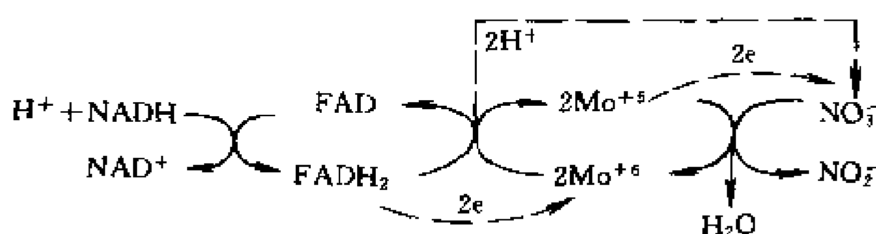


图 4-9　硝酸还原酶系催化 NO_3^- 还原示意

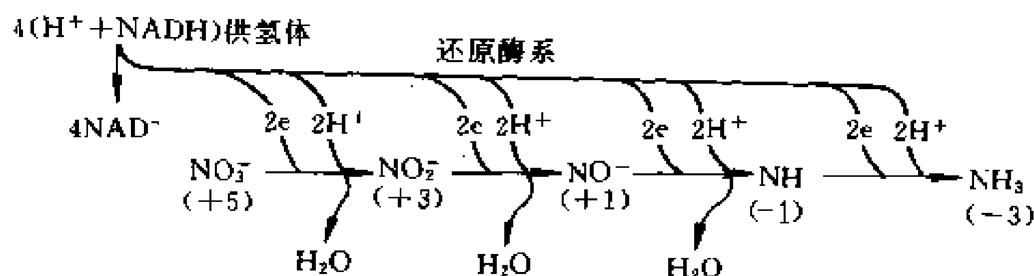
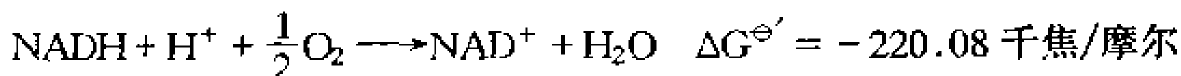


图 4-10　氮在还原酶系催化下的价数变化示意

供氢体$(NADH + H^+)$或 $FADH_2$ 各自均含有一对高转移势能的

电子和高转移力的质子。所以，在生物氧化还原电子传递过程中，往往需伴有辅酶(NAD^+ 或 FAD)的转移 H 或转移 e 的变化。如果它们将 H(或 e)供给氧分子，便会释放出大量自由能给予肌体，以满足生命活动的需要，即



$$NADH + H^+ + \frac{1}{2}O_2 \longrightarrow NAD^+ + H_2O \quad \Delta G^{\ominus'} = -220.08 \text{ 千焦/摩尔}$$



$$FADH_2 + \frac{1}{2}O_2 \longrightarrow FAD + H_2O \quad \Delta G^{\ominus'} = -181.59 \text{ 千焦/摩尔}$$

不过，来自 NADH 的电子可能先经过 FMN，然后按还原酶系中的传递次序，经一个个相邻的传递体往下传递，最后才传递给需还原的物质(如氧)而进行还原反应。

4.6 电子转移反应与线粒体关系

呼吸链之电子传递体是内膜组成组分。三羧酸循环、脂肪酸的β-氧化和氨基酸分解代谢等的酶除与内膜结合的 FAD 脱氢酶之外，均被认为包容于线粒体内膜所含的半流动性间质中，而 ATP 合成酶复合物 F_o 成分又是包埋在线粒体内膜所形成的嵴膜内。所以，真核细胞中除了丙酮酸是在细胞质由糖酵解产生外，所有呼吸代谢都是在线粒体内进行的，葡萄糖完全分解过程中所形成的 ATP，除了 2 个之外其余的均在线粒体中合成。

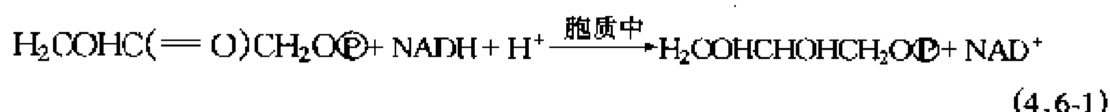
在胞质中许多低相对分子质量的溶解物能自由地渗透线粒体外膜，可是对于内膜，仅在膜上有专一传递系统的有机分子方能跨内膜转运，例如丙酮酸、柠檬酸、苹果酸、反丁烯二酸、琥珀酸、天冬氨酸、谷氨酸、α-酮戊二酸和脂肪酸，还有磷酸类 ADP 和 ATP。这些专一传递系统经常是传递一种溶解物向内转运时，伴随着另一种溶解物向外运行，例如二羧酸传递系统允许苹果酸、琥珀酸及反丁烯二酸彼此互换转运，或它们中任何一种可和磷酸类互换转运。三羧酸传递系统可使柠檬酸和异柠檬酸间彼此互换，或者和二羧酸传递系统传

递的二羧酸进行互换转运，它们对应地穿梭转运而形成一对称梭系；有的有机小分子转运时，是与质子向线粒体运动相偶联，并被质子跨膜运动所驱动，例如在胞质中糖酵解产生的丙酮酸，是在线粒体中通过三羧酸循环而消耗的，它是由一个质子向内转移的同时推动向内转移的，可以说丙酮酸转运依赖于跨线粒体膜 pH 梯度的存在和大小。

由于线粒体内膜对一些辅酶如 NAD^+、NADH、$NADP^+$、NADPH、C_oA 和乙酰-C_oA 等没有专一传递载体，它们都不能通过内膜，而在线粒体内外被物理地分开。在胞质中生成的所有 NADH 必须通过电子向内转运至内膜电子传递链上，而 NADH 本身不能透入膜中。于是胞质中的 NADH 只能转移其电子给有机分子，然后由有机分子载运电子至线粒体，在那里被氧化而将电子转移给内膜里的辅酶分子。

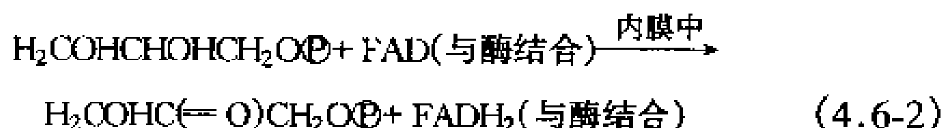
4.6.1 磷酸二羟丙酮/3-磷酸甘油梭系

最普通的传递系统是磷酸二羟丙酮/3-磷酸甘油梭系。在胞质中生成的 NADH，由磷酸甘油脱氢酶催化，将电子转移给磷酸二羟丙酮而进行氧化还原反应，得到 3-磷酸甘油和 NAD^+，即



$$H_2COHC(=O)CH_2O\text{Ⓟ} + NADH + H^+ \xrightarrow{\text{胞质中}} H_2COHCHOHCH_2O\text{Ⓟ} + NAD^+ \quad (4.6\text{-}1)$$

3-磷酸甘油会扩散而进入线粒体外膜，并遇到位于内膜外侧由 FAD 连接的磷酸甘油脱氢酶催化而再氧化，即



$$H_2COHCHOHCH_2O\text{Ⓟ} + FAD(\text{与酶结合}) \xrightarrow{\text{内膜中}} H_2COHC(=O)CH_2O\text{Ⓟ} + FADH_2(\text{与酶结合}) \quad (4.6\text{-}2)$$

在反应中生成的磷酸二羟丙酮又返回到细胞质里，在膜外是另一 NADH 分子氧化的电子受体，参见图 4-11。电子通过位于内膜里的还原酶复合物被传递到辅酶 Q。NADH 脱氢酶、琥珀酸脱氢酶也和磷酸甘油脱氢酶类同。

细胞质中生成的 NADH 和内膜结合于酶的 $FADH_2$ 间，其自由

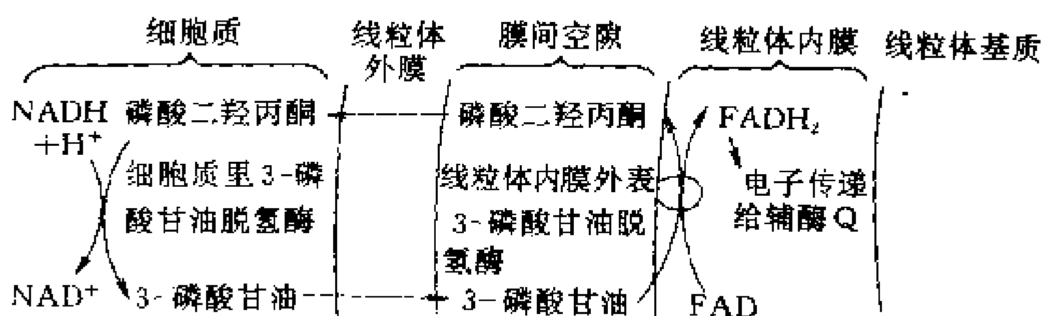


图 4-11　3-磷酸甘油/磷酸二羟丙酮梭系从胞质中由 NADH 转移电子至线粒体内膜电子传递链上的机理

电子以 3-磷酸甘油形式向内运送

能变化的差值约为

$$\Delta G = -nF[(\varphi^{\ominus'}_{FADH_2} - \varphi^{\ominus'}_{NADH}) = -2\times96485\times[-0.06-(-0.32)]$$

$$= -50.17 \text{ 千焦}$$

这种自由能差值可放能做电功，导致该梭系的电子向内转运成为单向不可逆的。进入的电子直接从结合在内膜脱氢酶上的 $FADH_2$ 转移到辅酶 Q。电子的转移越过了电子传递链上第一个能量储存位置，因此，每对电子只能产生 2 个 ATP 分子，而线粒体脱氢酶系统连接 NADH 的氧化作用可得 3 个 ATP 分子。对于磷酸甘油/磷酸二羟丙酮梭系，由于磷酸甘油被内膜外表面的黄素酶氧化而成为磷酸二羟丙酮，并作为互换的梭系则不会让磷酸二羟丙酮进入线粒体内。

4.6.2　苹果酸/天冬氨酸梭系

苹果酸/天冬氨酸梭系却有可能进出肝脏和心脏细胞中的线粒内膜而实现互换。由线粒体外 NADH 转移的电子，在胞质中特有的苹果酸脱氢酶的同功酶催化下，用于还原草酰乙酸成为苹果酸，且通过专一传递系统将其转运到内膜，又被线粒体的苹果酸脱氢酶的同功酶催化，与基质中的 NAD^+ 发生氧化还原反应而生成草酰乙酸和 NADH，净结果是电子从胞质里的 NADH 转移至基质里之 NADH。在此情况下，电子向内转移的驱动力是胞质和线粒体中辅酶 NADH 的相对浓度，它也会形成膜电位。

由于这种梭系是双向的，而且草酰乙酸不能透过内膜，故苹果酸/天冬氨酸梭系（见图 4-12）比磷酸甘油/磷酸二羟丙酮梭系更为复杂。草酰乙酸可在谷草转氨酶催化下生成天冬氨酸，并跨膜运转到膜外，又在该转氨酶催化下进行逆反应而形成草酰乙酸。因此，NADH 跨线粒体内膜转运电子，由于草酰乙酸不能渗透内膜，则由苹果酸—天冬氨酸和 α-酮戊二酸—谷氨酸二个梭系中各自对应物的互换来完成。

具有 ATP 合成酶活性的 F_1 因子位于基质一边内膜的嵴上，所以伴随电子传递生成的 ATP 是在膜里面，而在细胞中 ATP 参与的代谢过程大多是于线粒体外面，ATP 通过专一的传递载体系统向外流动并与 ADP 偶联向内转移。

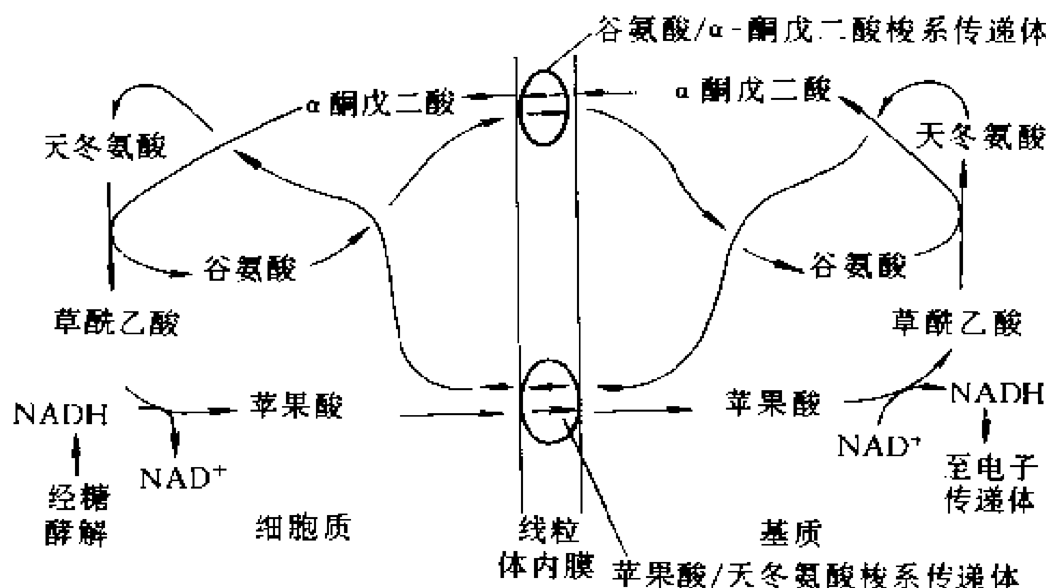


图 4-12　从 NADH 跨线粒体内膜转运电子的苹果酸-天冬氨酸和谷氨酸-α-酮戊二酸两梭系

4.7　光合作用

人和动物务必摄入和利用糖类化合物，但不能在机体内将 CO_2

和 H_2O 合成糖类化合物。可见,其分解代谢最后经三羧酸循环或磷酸戊糖循环等彻底氧化成 H_2O 和 CO_2 是一不可逆过程。

光合细菌和绿色植物可以利用太阳光的电磁能,驱动 CO_2 和 H_2O 进行逆向反应合成糖类化合物,而由 CO_2 和 H_2O 合成葡萄糖的 $\Delta G^{\ominus}$ 约为 +2870.2 千焦/摩尔(27℃时的平衡常数为 10^{-496})。

光虽然在空间和时间上以正弦方式振动的电磁波传播,但是它与物质却以光量子形式作用,分子中的电子若接受光子便会激发至较高的相应能级上活化,每个光子具有一定能量 $\varepsilon = h\nu$(即 ε 与电磁场振动频率成正比,h 为普朗克常数 6.63×10^{-34} 焦·秒),1 摩尔光子称 1einstein,$U = L\varepsilon = Lh\nu$,$\nu = c/\lambda$(真空光速 c 为 3×10^{10} $cm \cdot s^{-1}$),L 为亚佛加德罗常数。蓝光波长在 450nm 区($\nu \approx 6.7 \times 10^{14} S^{-1}$),能量约为 267.8 千焦/einstein。红光波长在 700nm(波长在 750nm 至 400nm 之外的辐射是人眼所看不到的,通常称辐射能,许多细菌常利用长于 800nm 的辐射能。)的能量约为 171.5 千焦/einstein。这意味着由 CO_2 和 H_2O 合成每摩尔葡萄糖原则上需要 17einstein 的红光光子能量,按照热力学观点,实际上它所需尚比这更多的能量才有可能实现其合成。紫外或红外的光辐射,在生物学上是颇为重要的。

4.7.1 电磁能转化学能的光合作用与叶绿素关系

绿色植物进行光合作用的特有细胞器是叶绿体,它具有双膜结构,即有两层外膜和一个广泛伸展的称为类囊体膜的内膜,内分基质(stroma)和基粒(granum)。基粒分散在基质中,由类囊体(thylakoid)堆集而成,基粒之间是以片层结构相连。类囊体是由与内膜相同组成的膜包被之小胞,通常以片层形式存在,且各片层间彼此相互连接,是高度折叠的单膜,在拓扑学上是封闭的,故有一定的内面和外面。在光反应过程中起主要作用的是光合色素,在叶绿体见到的叶绿素是与类囊体膜上的疏水性蛋白质结合的,它和相关的电子传递成分都分布在类囊体膜上,呈现各向异性和有序化,这是高效地进行光反应的保证。类囊体膜尚含有一大批电子载体和一个 ATP

酶，这与线粒体中偶联的 ATP 酶相类似。这些酶是一些可溶性蛋白，存在于包围着内囊体膜的基质中，担负着 CO_2 固定和糖的合成。

光合细菌的光化学反应发生在封闭细胞的膜上，该膜高度内陷。当细胞被超声波破碎时，此膜碎片朝内挤压而形成小的囊泡称作载色体，这种载色体含有光合作用器官中所有与膜结合的组分。

除了一些嗜盐菌之外，所有已知进行光合作用的生物均是利用某一类叶绿素的光化学反应性。基本上具有含附加环V四联吡咯的

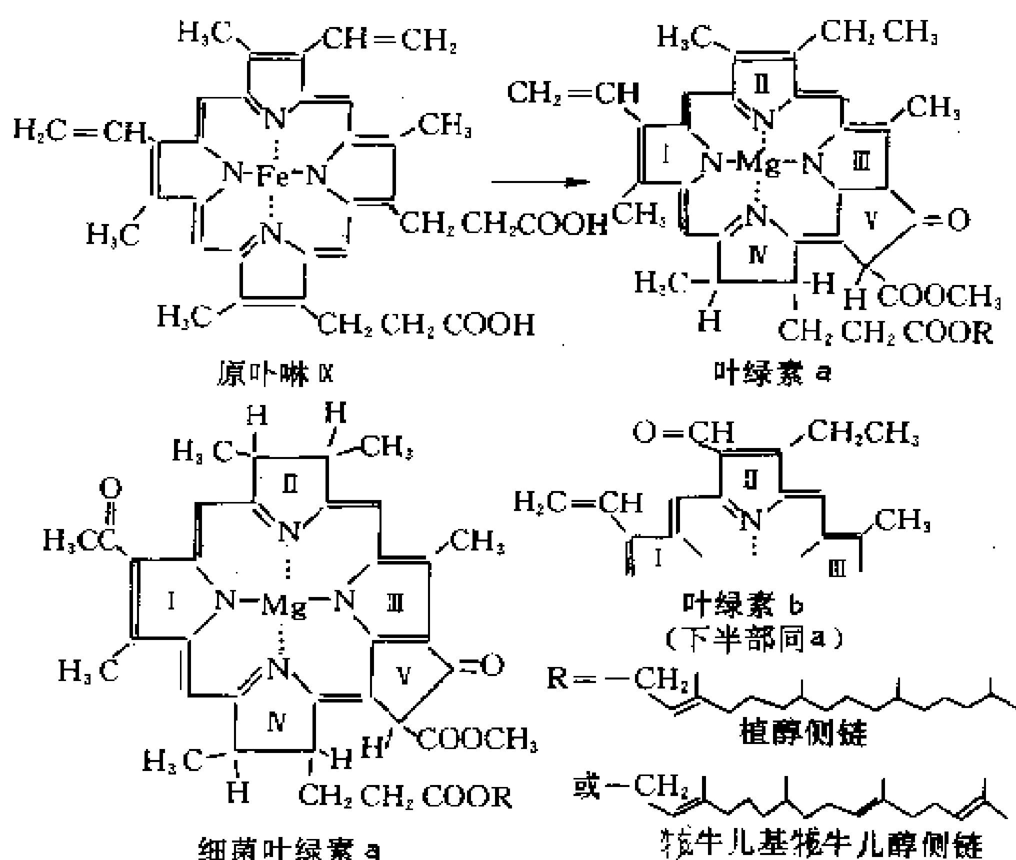


图 4-13　叶绿素 a 和 b，细菌叶绿素 a 和原卟啉Ⅸ的结构

叶绿素（见图 4-13），都是由原卟啉Ⅸ经过生物合成而形成的，是含镁的卟啉衍生物，在叶绿体类囊体膜中位于蛋白质与脂类物质的交界面，不仅具有亲水性，而且还有亲脂性，往往通过特定蛋白的作用，数以百计的分子成丛地聚集在一起。

叶绿素是一个多共轭双键的分子，能吸收可见光能，激发后放出高能电子，传递激发能。它有abcd四种，带植醇侧链，常见的是a和b，其环Ⅱ上的取代基不同，致使叶绿素a在685nm有一强吸收带，叶绿素b在650nm处也有一相似的吸收带。细菌叶绿素根据种类不同可含R＝植醇或牻牛儿基牻牛儿醇，约在780nm处有一极强的吸收带。

一个在空间具有特定取向的分子，一般仅吸收相对于分子轴以一定方式偏振的光。例如在细菌叶绿素中吸收的780nm光电场务必是在分子平面中偏振的，而且基本上与π-电子系统的长轴相平行(即顺着连接环Ⅰ和环Ⅲ的轴)。一个分子吸收特定波长光的能力是以该分子的摩尔消光系数ε表达(量纲为$L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$)。如果一束强度为$I_0$的入射光射至浓度为$C(mol \times L^{-1})$和厚度为$d(cm)$之样品上，可由Beer-Lam bert定律给出透过样品的光强度I是

$$I = I_0 \times 10^{-\varepsilon cd} \quad (4.7\text{-}1)$$

式中　εcd——代表样品的吸光度或光密度(OD)，量纲为一。

由于电子在分子或原子中的分布是以量子力学薛定谔波动方程解的波函数描述的，在给定点任何给定时刻找到一电子的几率与该点此刻的波函数之平方成正比。在一个孤立的分子中，一个电子的势能主要是由该电子与核及与其它电子的库仑相互作用决定的，薛定谔方程对这样的系统有一系列不同之解，相应的是不同的电子轨道。

每个轨道在该系统的总能量中占有一特定值，即分子的能量是量子化的，只要势能不变，每个电子永远在特定分子轨道上运动。在光的照射下，振动的电场会使势能强烈地随时间而变化，于是在给定点的一个电子几率也随时间而变化。所以光会导致一个电子从一个轨道跃迁至另一个轨道，此跃迁过程必须满足以下条件：两个轨道间的能量差必须与光子的能量hν相同(这是分子仅吸收特定波长光之故)；电场引起的变化必须使两个轨道间的相似性接近(相似性与轨道空间排布和形状、振动电场取向以及核间距等有关)，这是由于

分子只吸收特定波长光和向某些轨道跃迁几率最大而某些吸收带吸收最强所致。

当叶绿素吸收光子时，激发分子内的电子从一个轨道到另一个能量较高的轨道后，激发分子可以几种不同方式释放所吸收的能量而衰变回原基态。其中的一种可能性是核弛豫（能量的耗散）过程中以热的形式释放部分能量，从而降低了激发分子的能量至最低的单线态〔激发电子占据不同轨道时，两不配对电子自旋相同（平行）的激发态称三线态，而电子自旋不同（反平行）的称单线态。〕，于是只能发射荧光（详见第六章），而这种荧光的波长通常是比最长波长的吸收带稍长些。在某些场合下，激发分子经激发可全部转化为热能的无辐射释能过程而衰变回基态。第三种衰变方式是以共振能转移给邻近的分子，这是光合作用中的重要现象。

第四种可能性是激发分子将电子转移给邻近的分子，呈现光化学电子转移反应。由于激发到较高能级轨道上的电子被束缚较松，电子转移就可成为易于发生的激发分子衰变途径。叶绿素基态还原电极电位 $\varphi_{基}^{\ominus'}$ 约为 +0.5V，长波长吸收带的 $h\nu$（激发能）约为 1.5eV，激发分子的 $\varphi_{激}^{\ominus'}$ 约为 −1.0V。这说明激发分子转移电子的还原电极电位 $\varphi_{激}^{\ominus'}$ 要比基态的 $\varphi_{基}^{\ominus'}$ 更负，相差约 $h\nu/e$ 数值，所以叶绿素 a 的激发态可作为很强的还原剂，而 $NAD^+/NADH$ 还原电极电位 $\varphi^{\ominus'}$ 为 −0.32V，于是，两者配合就成为光合作用的光化学基本原理。

激发 1 分子叶绿素（或细菌叶绿素）或 1 个由几个这种分子构成的复合物（Chl），就会释放出 1 个电子，叶绿素分子被氧化，而其它某些分子（A）被还原，氧化了的叶绿素复合物（Chl^+）又作为一种较强的氧化剂，能从第三种分子（D）中夺取电子。可见图 4-14 的描述。

4.7.2 叶绿素的光电子转移反应

光合细菌只有喂以还原性物质（如有机酸）时方能生长旺盛，有些光合细菌在还原性无机物（如 H_2S）上也生长得较好，尽管并不产生 O_2，但完成的反应在形式上类似于植物的叶绿素。这些启发了

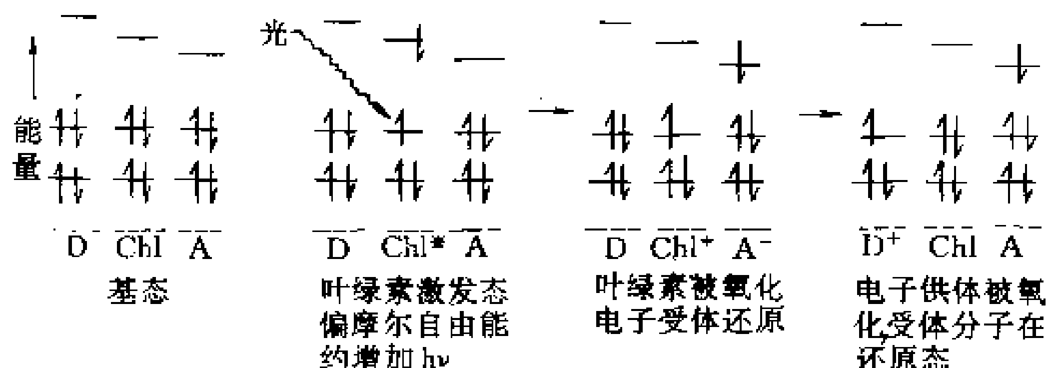
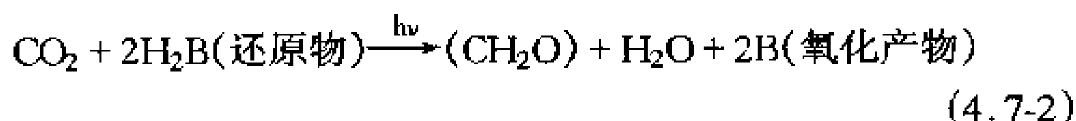


图 4-14 光合作用引起的光化学过程是电子转移反应

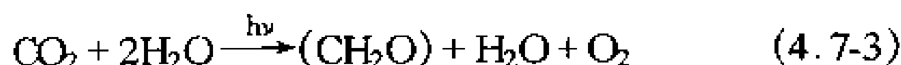
（在激发和起始电子传递反应等过程中，电子的自旋方向不变时，叶绿素或 Chl^+A^- 复合物处于单线状态。）

Van Niel，从而提出了光驱动氧化剂和还原剂反应的生物代谢设想，其反应可写成



$$CO_2 + 2H_2B(\text{还原物}) \xrightarrow{h\nu} (CH_2O) + H_2O + 2B(\text{氧化产物}) \quad (4.7\text{-}2)$$

在植物固定 CO_2 的反应中是以 H_2O 代 H_2B 和 O 代 B，即



$$CO_2 + 2H_2O \xrightarrow{h\nu} (CH_2O) + H_2O + O_2 \quad (4.7\text{-}3)$$

Van Niel 认为，在光化学反应中产生的还原剂（A^-）可以提供电子而将 CO_2 还原成糖，且产生的氧化剂（D^+）在植物中能接受电子而将 H_2O 氧化成 O_2，在光合细菌中则氧化其它物质（如 H_2B），使光化学反应中被氧化的物质（D^+）复原。

R. Hill 发现，分离的叶绿体如果加入与生理需要无关的电子受体物质如铁氰化物 $[Fe(CN)_6]^{3-}$ 或苯醌，即会产生 O_2，在这种没有 CO_2 参与的条件下也发生电子受体被还原的过程，证明光合作用的光化学反应显然可同有 CO_2 参与的反应分离。H. Gaffron 也发现，绿藻在某种条件下的光辐射，可使电子由 H_2 转移到 CO_2 分子而不产生 O_2。光氧化的活性叶绿素（或细菌叶绿素）是结合在称作反应中心的一个蛋白质上。R. Clayton 利用去污的表面活性剂破取光合

细菌叶绿体或载色体，再用常规分离纯化蛋白质的方法而分离纯化了反应中心，纯化的细菌反应中心能完成电荷的初级光化学分离。

L. Duysens 认为，光合细菌受光辐射时，在 870nm 的吸光度有所削弱，这是细菌叶绿素复合物在此波长有一主要吸收带，光照后使该细菌叶绿素复合物产生光氧化作用，则其未氧化状态量有所减少之故，他将此复合物简称为"P870"。Kok 观察到叶绿体中含有在 700nm 处有吸收带的活性叶绿素复合物，称为"P700"。H. Witt 等又发现在 680nm 吸收带有第二个活性叶绿素复合物，他们称 P700 和 P680 为光合系统可分离的光合系统Ⅰ和光合系统Ⅱ的部分。生物化学学者发现，叶绿素或细菌叶绿素被氧化后的产物是阳离子自由基。光激电子不是镁供给，而是来自芳香族的 π-电子体系。这不同于前述细胞色素的氧化，细胞色素所移去的电子是中心配位铁原子由 $Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+}$ 之变化供给的。于是，叶绿素自由基的未配对电子之运动和所带正电荷就在整个 π-电子系统中广泛地离域化，这可利用电子自旋共振（ESR）谱和电子-核双共振（ENDOR）谱进行验证。体外叶绿素实验证明 P870 的光氧化反应是生成称 $P870^+$ 的阳离子自由基，它的 ESR 和 ENDOR 谱呈现该自由基的未配对电子，在反应中心 4 个细菌叶绿素分子之 2 个所形成特殊二聚体范围内离域化。

从紫细菌球形红假单胞菌或深红螺菌中分离出来的反应中心含有 3 个相对分子质量分别约为 21000、24000 和 28000 的疏水性多肽，而有 4 个分子的细菌叶绿素和 2 个分子细菌脱镁叶绿素共价结合在它们之上，其中细菌脱镁叶绿素是 2 个氢原子代替了中心的镁。一些反应中心还含有 2 分子泛醌和 1 分子非血红铁，另一些反应中心的一个泛醌被甲基萘醌类（如萘醌或维生素 K）分子所取代。紫细菌的活性叶绿素 P870，其光合作用初级电子受体是细菌叶绿素和脱镁叶绿素，$P^+ + e^- \longrightarrow P$（基态）的 $\varphi^{\ominus'}$ 约为 +0.45V，光化学反应次级电子受体是醌，次级电子供体是 c 型细胞色素。

分离植物光合系统Ⅰ中的反应中心，在其高度纯化了的制品里含有几个不同的多肽和多个叶绿素 a 分子，只有 P700 具有光化学活性。分离纯化了的光合系统Ⅱ中，其制备物也有几个多肽和 P680 中含多个叶绿素 a 分子。活性叶绿素 P700 的还原电极电位[$P^+ + e^- \longrightarrow P$(基态)]$\varphi^{\ominus'}$ 约为 +0.5V，光合作用初级电子受体是叶绿素 a，次级电子受体是铁硫蛋白，次级电子供体是铜蛋白（质体蓝素）。光系统Ⅱ的活性叶绿素是 P680，它的还原电极电位 $\varphi^{\ominus'}$ 大于 +0.82V，光合作用的初级电子受体是脱镁叶绿素 a，次级电子受体是醌，而次级电子供体是锰蛋白和水。

细菌叶绿素的 P870 或叶绿素的 P700 和 P680 仅是光合膜上占有色素的一小部分，大多数的细菌叶绿素或叶绿素是没有光化学活性的，它们仅起着被称为天线的作用，即吸收光而获得能量，通过共振能量转变为在分子间快速地传递，供给反应中心发生的光化学反应。测量由触角（天线）系统发出荧光寿命的信息，得知叶绿体在约 5×10^{-10}秒内其能量即能被反应中心捕获。当分离的细菌反应中心直接由光激发时，P870 的氧化约在 10^{-12}秒内发生。

区分触角（天线）系统和反应中心的实验是由 R. Emerson 与 W. Arnolol 于 20 世纪 30 年代作出的贡献。他们测量了反复用于闪光激发绿藻悬浮液时的氧释放量，发现每次闪光产氧量最多时的间隙需 20ms 的黑暗时间，且每次的闪光产氧量会由于两次闪光间之时间间隙的缩短而降低。由此可知，反应中心被氧化了的叶绿素复合物必须在两次闪光激发反应间隙内回到还原状态，而将电子从叶绿素复合物中取走的初级电子受体也务必重新氧化，如果第二次的闪光激发太早，其能量主要会被以热和荧光消耗掉。

他们又测量了在闪光时间选择为最佳时间的每次闪光产氧量，发现产氧量取决于闪光的强度，当闪光足够强时它就达到了一个平坡区，此时的闪光达到了饱和强度；当采用饱和强度的闪光时，其产氧量相对于藻类的叶绿素含量而言还是很小的，即细胞约含 2500 个

叶绿素分子的叶绿素量才会产生 1 个 O_2 分子，表明参加 CO_2 固定和产生 O_2 的光化学活性叶绿素只是少数，大部分叶绿素是触角（天线）系统的一个部分。叶绿素产生 1 分子 O_2 必须吸收约 8 个光子，因为闪光强度大时，与每次闪光产氧量有关的反应中心浓度比叶绿素的总浓度小得多，例如每分子 P700 或 P680 所含的叶绿素量约为 400，而每产生 1 个 O_2 分子却要 2500 个叶绿素。

上述实验引出了光合作用单元概念，即光合作用单元是由数以百计成丛的叶绿素分子组成，这些叶绿素分子在化学上尽管完全相同，但由于所处的环境不同，则有"分工"的差异，大部分分子仅起吸收光能，传递激发能的作用，称为"天线"或"触角"分子；极少数分子位于反应中心，接受传递来的激发能，将光能转变为化学能。天线或触角分子吸收的能量在光合作用单元内可跳跃式地转移，最后跳到反应中心的叶绿素分子。如此的转移速度非常快，一般小于 10^{-10}s。参见图 4-15 光合作用单元示意。

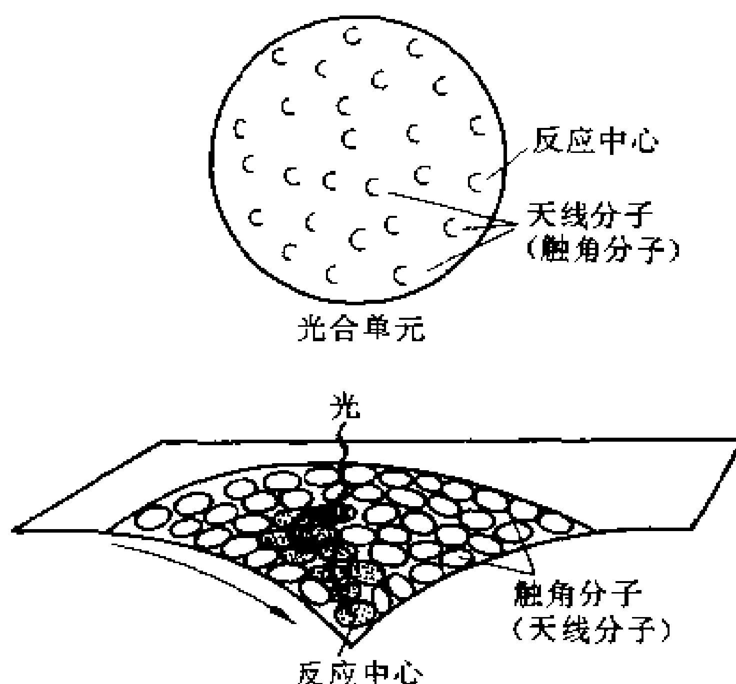


图 4-15　光合作用单元示意

从叶绿素中分离出来的复合物，是含有 3 分子叶绿素 a、3 分子叶绿素 b 和 1 分子类胡萝卜素的复合物。据了解每个疏水性蛋白质结合了少量色素而形成复合物，并聚集排列成较大的形态而使激发能在复合物间快速地传递。分离到的野生球形红假单胞菌，这种天线即触角复合物有 3 个细菌叶绿素分子。自绿光合细菌中分离又被结晶的复合物有 7 个分子的细菌叶绿素 a，其结构曾用 X-光衍射测定过。触角系统还含有各种其它的色素如类胡萝卜素，这种辅助色素可将能量转移给叶绿素，弥补了叶绿素对某些光谱区域(如绿光)吸收不好的空缺。以热力学观点来看，这种能量的转移因叶绿素第一激发单线态的能级相对较低而耗散大。

类胡萝卜素是线性多烯分子，除了将吸收的光能传递给叶绿素之外，还可在强光下担负着保护细胞免受 O_2 损伤的重要作用。如果触角系统受光照射太快，虽然叶绿素分子将大部分多余的能量以荧光和热的形式散发掉，尚有部分激发分子可能通过"系统间穿越"而形成激发三线态(激发到高能级的 1 个未配对电子与留在原能级上 1 个未配对电子两者自旋平行)，也就有可能通过与分子氧反应，使叶绿素分子返回基态，促使 O_2 不呈三线态的基态而处在激发单线态。单线态的 O_2 能与蛋白质、核酸和脂类中的种种基团进行损伤细胞组分的不可逆反应。类胡萝卜素能使叶绿素的激发三线态在与 O_2 反应之前猝灭，也能使单线态 O_2 猝灭。以上两种猝灭过程均通过类胡萝卜素而被激发成三线态来实现的，然类胡萝卜素的激发三线态可无害地衰变而回到基态。这种激发态以无辐射方式回到基态或低激发态的过程称作猝灭，即一种可以加速电子激发态衰变到基态或低激发态的物质叫猝灭剂，有关过程称为态的猝灭。

4.7.3 光合作用的电子传递系统

(一)细菌的电子传递系统

由于这类细菌的光合反应中心可分离为一种简单形式，于是推测光合细菌的电子传递系统可能仅含一种类型的反应中心。对此类反应中心以皮秒(picosecond，缩写为 ps，即微微秒 s = 10^{-12}秒)和纳

秒(nanosecond,缩写 ns,即毫微秒 ns = 10^{-9}秒)的闪光及光谱技术进行研究,即让分离的反应中心用闪光激发,并以分光光度法检测,指出在细菌反应中心内目前探测到的初始电子受体是细菌中另一种叶绿素。当分离的反应中心用亚皮秒(Subpicosecond,短于皮秒)的闪光激发时,在约 10^{-12}s 内形成瞬间态,在分光光度法检测的谱图中,P870 和细菌叶绿素的吸收带变弱,且出现了可能是细菌叶绿素的阴离子自由基($Bchl^-$)形成的吸收带,由此推测上述约 10^{-12}s 内所形成的瞬间态似乎是 P870$Bchl^-$ 的电荷转移态。此初始的电荷转移态在约 4×10^{-12}s 后,将 $Bchl^-$ 所带的一个电子转移至一个细菌脱镁叶绿素(Bph)而衰变,这也可以由分光光度法的谱图中细菌脱镁叶绿素吸收带变弱,以及细菌叶绿素的重新出现而得到表征。

从电子转移自发过程考虑,自由能大到小的顺序是 P870 的最低激发单线态($P870^*$ Bchl Bph Q_A),其次为 $P870^+Bchl^-$ Bph Q_A 态,继而是 $P870^+$ Bchl Bph^- Q_A 态,参见图 4-16。其中的 $P870^+$ Bchl Bph^- Q_A 态可持续 2×10^{-10}s(即<200ps),它通过电子流向泛醌分子(Q_A)而衰变。从现象方面来看,不仅电子传递反应很快,而且它几乎与温度无关,甚至有些光化反应还随温度的降低而使反应速度加快,表明参与电子传递反应的组分不仅要与反应中心靠得很近,而且运动的自由度都必须很小。这些反应效率通常是以 $P870^+$ Bchl BphQ_A^- 的量子产率来表示,它是吸收每爱因斯坦(einstein)光量子所形成 $P870^+$ Bchl BphQ_A^- 的量(摩尔),而 1 个爱因斯坦是活化 1 摩尔的分子所吸收 L(阿佛加德罗常数,即为 1 摩尔的量子数)个量子的总能量,它等于 $Lh\nu = Lhc/\lambda$,在分离的反应中心测得的量子产率为 1.02 ± 0.04。效率如此之高说明反应中心每次被激发时,便有一个电子自 P870 流向 Q_A,一些竞争过程如荧光衰变或电子逆迁移似乎没有发生。

一个电子自 Q_A^- 移向 Q_B(第二个醌)约需 10^{-4}s,比前面的电子转移所需时间长得多,甚至随温度下降而变得更慢。通常一个电子转移使 Q_B 保持半醌形式(Q_B^-)直到反应中心被第二次激发。在细

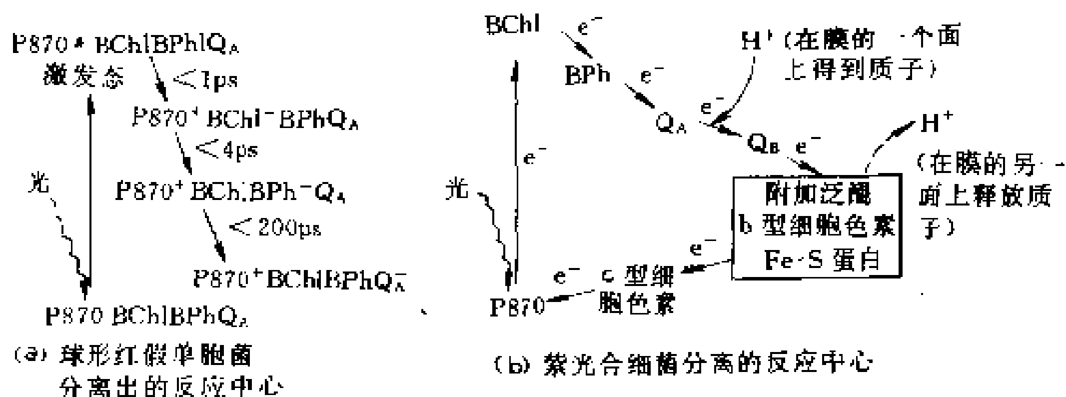


图 4-16 菌类反应中心的初始电子传递顺序

(a)中不同状态按能量大小排列，最高自由能的在顶处，绿光合细菌含有一系列不同的电子受体，类似于植物光合系统Ⅰ。(b)中电子转移途径包含 Q_A、Q_B 二个泛醌、附加醌和细胞色素等一连串电子传递体，返回 P870。电子传递体按还原电极电位 $\varphi^{\ominus'}$ 最负的(最强还原剂)在顶处。电子按箭头流向是自发的。

胞色素和 P870 之间的电子传递所需时间随着种类而不同(约为 10^{-6} 至 10^{-3}s)。当反应中心第二次激发时，第 2 个电子由 P870 依次转移顺序到细菌叶绿素(Bchl)、细菌脱镁叶绿素(Bph)、Q_A 和 Q_B，使 Q_B 形成 2 个电子还原状态(Q_B^{2-})。当 Q_B 被 2 个电子还原时，细胞内膜上便获得来自细胞中水相的 2 个质子而转化为二氢醌(Q_BH_2)，且质子被转移透过膜而于另一膜面上释放出去，从而产生了跨膜的电化学位梯度，该梯度可以驱动 ATP 的合成。

转移到 Q_B 的电子通过一些其它电子传递体组成的传递链回到 P870 而呈环状，这方面尚未完全弄清。电子的环流驱动质子的跨膜运动，使细胞内的 pH 对比细胞外的显得较大，且带负电，这有利于质子由 ATP 酶导流向细胞内输运。此输运过程与 ATP 的形成同时偶联，类似线粒体内膜上输导 H^+ 的 ATP 酶。ATP 和电化学位梯度还能驱动各种还原剂上的电子转移到 NADP 的反应，于是将 CO_2 还原为糖。

(二)叶绿体电子传递系统的基本光合作用

植物的光合作用电子传递链与细菌的有所不同，它有两个顺序连接的光合系统Ⅰ和光合系统Ⅱ，它们呈线性关系，也有可能存在某种环状的电子流动。

光合系统Ⅰ和光合系统Ⅱ分别含有P700和P680类型的反应中心，以及它们各自连接的天线(触角)色素和初始电子受体与供体。1960年，R. Hill和F. Bendall根据大量的证据，首次提出了所谓的Z方案，指出系统Ⅰ中的P700受光合激发会产生一个强的还原剂，它将电子历经几个次级电子传递链而转移到NADP。受激发的系统Ⅱ之P680产生了一个强氧化剂，它将H_2O氧化成O_2，系统Ⅱ内所形成的还原剂将电子转移到连接两个光合系统的一系列电子传递体上。

两个系统间的电子传递链包含几个醌类分子(质体醌)，即一个c型细胞色素和一个铜蛋白(质体蓝素)，还可能含有一个铁硫蛋白，参见图4-17。某种还原剂可将电子转移给予连接系统的传递链中之电子传递体，系统Ⅰ则能继续正常发挥其功能。倘若改变光的波长而进行激发，发现系统Ⅰ可以吸收和利用达700nm的所有波长之光；类似的测试却发现系统Ⅱ不能很好地接受远红光的激发。如果仅用远红光激发，系统间之电子传递体储备库的电子便会消耗，P700将无电子补充而仍保持氧化状态，它也就不能继续对光作出反应。系统Ⅱ具有很好地吸收绿光的特性，因此照射绿光能使系统Ⅱ激发，这样电子传递体储备库便会发挥作用而得到补充电子，绿光照射停止之后，仍有足够的电子可传递，也就是说，即使经历了一段时间的黑暗，在此期间远红光尚能有效地利用。

L. Duysens等用吸收光谱直接测量了几个电子传递体所处的氧化和还原状态，首先发现随着细胞色素f被氧化而其吸收光谱有显著地变化。

某个产物生成的量子产率可由下式定义：

$$\phi=\frac{\text{生成产物的数量}}{\text{吸收辐射量}}=\frac{\text{产物形成的速度}}{\text{吸收辐射的速度}}$$

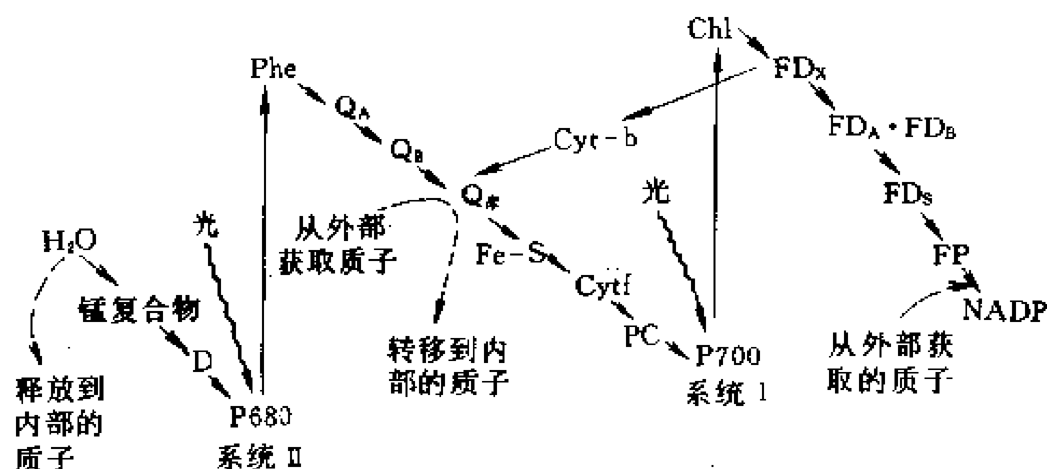


图 4-17　植物光合作用的 Z 方案

phe＝脱镁叶绿素 a，Q_A、Q_B＝2 种质体醌，Q 库＝质体醌大贮存库，Fe-S＝铁硫蛋白(M)，Cyt-b＝细胞色素 b563，Cyt-f＝细胞色素 f，PC＝质体蓝素，Chl＝叶绿素 a，FD_X、FD_A、FD_B＝铁硫蛋白(结合的铁氧还蛋白)，FD_S＝可溶性铁氧还蛋白，FP＝铁氧还蛋白-NADP 氧化还原酶(黄素蛋白)。D(或称 Z)组分尚未得鉴定，FD_X 有时称 X 或 A_2。虚线箭头为电子传递与跨类囊体膜的质子转位相偶联。

在此的量子产率系指产氧的数量与吸收光的爱因斯坦数或光子数比值。在藻类产氧的量子产率测定中，观察到 400 至 675nm 间绿藻的量子产率与波长相对地无关，然在长于 680nm 的远红区域下降很快。R. Emerson 将一弱绿光叠加于 700nm 光上，发现从 680 至 710nm 的光量子效率大大地增加。J. Myers 和 C. S. French 发现，即使在红光照射前几秒钟将绿光关闭也能提高远红光的量子效率。

一些实验的观察结果，可以用系统 I 和系统 II 串联光合作用的 Z 方案对其进行解释。当系统 II 中的电子流量与系统 I 内的相等时，光的利用率达到了最高，否则便会相互阻尼而使部分能量耗散，即某些波长的光对一系统的激发频率高而对另一系统的低，于是有一部分光将被浪费掉。曾经用系统封闭阻断剂如 3-(3，4-二氯苯基)-1，1-二甲基脲(DCMU，一种除草剂)将挨近系统 II 的两个醌间的电子传递阻断，来探讨不同波长之光激发两个光合系统的光利用率。当以远红光照射藻类细胞时，可将所有细胞色素 f 基本上都氧

化，而附加绿光照射，部分细胞色素 f 又能迅速地返回还原状态。在如此的照光过程中，一些细胞色素 f 可在氧化态和还原态间反复变换，也就是说，它们的群体是处于部分氧化和部分还原的状态。如果绿光停止照射，细胞色素 f 就会回复到完全氧化状态。当红光不存在且细胞色素大部分呈还原态时，绿光也能引起氧化作用。

以上现象表明，绿光可以调节细胞色素 f 的还原程度，它能激发系统Ⅱ和系统Ⅰ，然远红光只能引起细胞色素 f 的氧化。实验表征了系统Ⅰ可从系统间的电子传递体(也是电子载体)中吸收电子，而系统Ⅱ却能将电子供给系统间的这些电子传递体。

质体醌与泛醌仅是环上的取代物不同，参见图 4-18，所以光合系统Ⅱ的电子受体与细菌反应中心的相似，质体醌是光系统Ⅱ还原端电子受体，继先还原脱镁叶绿素 a 之后，成为第二位和第三位电子受体。每次 1 个电子从第一个质体醌传递到第二个质体醌。靠近这 2 个醌的 1 个铁原子很可能在它们之间的电子传递中起作用，当第二个醌被双重还原时，就将 1 对电子输入反应中心含 5 到 10 个质体醌的质体醌贮存库，此库似乎也可以储蓄来自许多不同反应中心的电子。电子可能再通过铁硫蛋白从质体醌库流向细胞色素 f，由此细胞色素 f 将铜蛋白质体蓝素还原，又从质体蓝素提供 1 个电子给 P700。

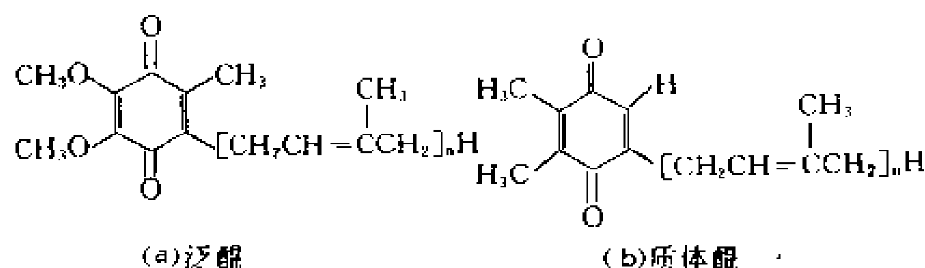


图 4-18　泛醌(a)和质体醌(b)的侧链异戊二烯数目 n 随种类不同而异，泛醌一般为 7～10，质体醌为 9

某些种类的藻类中没有质体蓝素，而是由 c 型细胞色素所代替。当质体醌被光合系统Ⅱ还原时，质子显然是在类囊体膜的外表

面获得的，而质体醌被重新氧化时，质子在膜的内表面放出，可能是每传递 1 个电子与输送 1 个质子相偶联。H_2O 氧化生成 O_2 时，质子也是在膜的内表面释放，由 1 个 ATP 酶导流质子通过类囊体膜回到外表面，在 NADP 还原成 NADPH 时，质子便在外部被结合，此过程推动了合成 ATP。

光合系统I的还原端先以 1 个分子叶绿素 a 为电子受体，与光合系统II（脱镁叶绿素 a）和光合细菌（细菌叶绿素、细菌脱镁叶绿素）的反应中心有些相似之外，继而是由一组含铁硫蛋白的电子受体起传递作用。由鉴定得知铁硫蛋白是一种称作铁氧还蛋白的可溶性蛋白质，已发现有多种不同的：叶绿体中可溶性铁氧还蛋白含 2 个铁原子和 2 个无机硫醚键（见图 4-19(a)），并结合于 4 个半胱氨酸残基的硫原子上；光合系统中尚含 3 种分别称为 FD_X、FD_A 和 FD_B 不易溶解而呈结合性的铁氧还蛋白，它们可能是有 4 个铁原子和 4 个硫醚键（4 铁-4 硫簇），在立方结构中被 4 个半胱氨酸连接（见图 4-19(b)），其中的 FD_X 也可能仅含 2 个铁原子。铁氧还蛋白与弱酸作用会释放 H_2S，这是鉴别铁氧还蛋白质既简单又灵敏的方法。铁氧还蛋白的一电子之还原电极电位 $\varphi^{\ominus'}$：叶绿体可溶性铁氧还蛋白的为 $-0.4V$；FD_X 的为 $-0.7V$；FD_A 和 FD_B 的依次为 $-0.54V$、$-0.59V$。可以通过还原态铁氧还蛋白的顺磁共振（ESR）信号以及 430nm 附近的光吸收少量减少的检测，来发现铁氧还蛋白的还原作用。

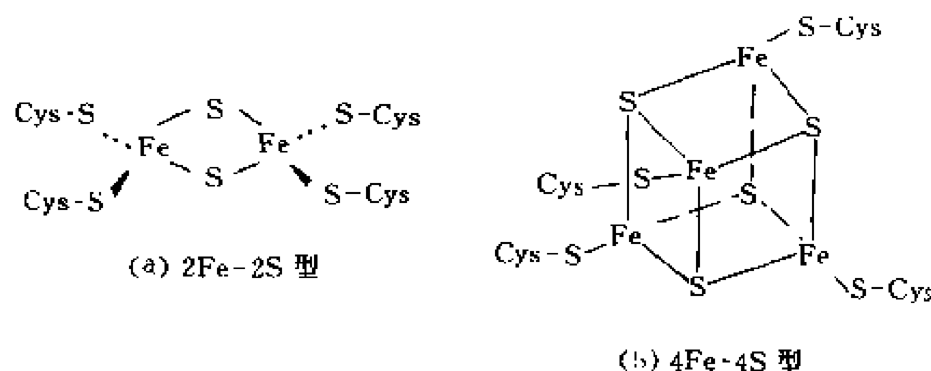


图 4-19 铁硫复合物中已知的两种类型结构

FD_X似乎是被与P700反应的叶绿素a分子还原，继而将电子转移给FD_A和FD_B，然后经FD_S再流向铁氧还蛋白-NADP氧化还原酶(黄素蛋白)，并还原NADP。当可还原的NADP有限时，光合系统Ⅰ传出的电子便会输送给细胞色素b563，随后再回到位于两个光合系统之间质体醌储存库中，这种电子循环过程是与质子转位跨越类囊体膜相偶联的。由此推测，这是维持ATP供应以驱动CO_2的固定或其它需能过程，因为每固定1分子CO_2需要2当量的NADPH和3当量ATP。在连续光照射的情况下，其中1当量的ATP是从循环电子传递途径中得到的，而NADPH以及其余的2当量ATP是由非循环电子传递途径中得来的。

4-7.4 光合产氧和固定碳之探讨

(一)氧的释放

P. Joliot于叶绿体或藻类经历一段黑暗时间后，以一系列短暂闪光照射测量了每次闪光的产O_2量时，发现第一次或第二次闪光时基本上没有或很少O_2产生，第三次闪光时却出现突发性产O_2量增加，往后每四次闪光间隔过程的产O_2量由低到极大值振荡呈阻尼型的上下变动，逐渐趋于某一产O_2量的上下波动，参见图4-20。

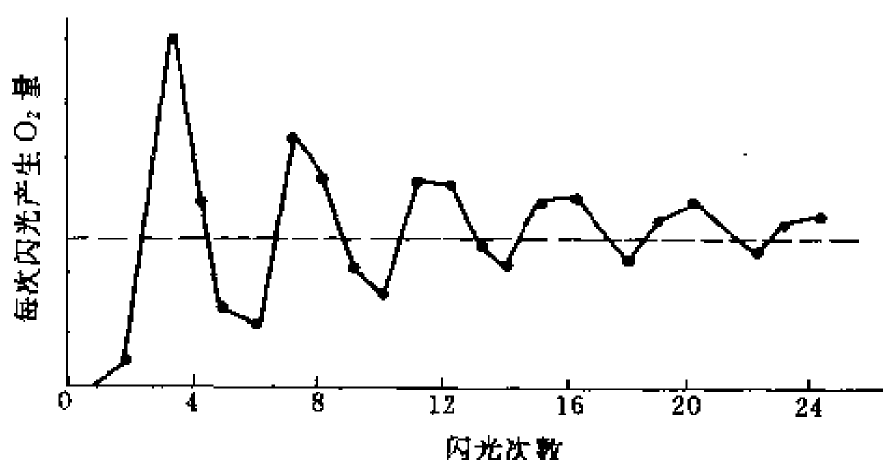


图4-20 黑暗中保存分离的叶绿体一段时间后的闪光效应
起始两次闪光没有或很少产O_2，虚线表示保持某一水平。

实验表明,每个光系统Ⅱ反应中心每次传递1个电子,经历了一系列氧化状态,每向下一状态变化时吸收1个光子,反应中心累积了4个氧化态相当物后才会产生O_2。将H_2O氧化成O_2的过程,每产生1个O_2分子需要转移掉4个电子,而每个电子都务必经历系统Ⅰ和系统Ⅱ的光化学反应。于是,可以预计每释放1个O_2分子至少需吸收8个光子。通过对产生O_2时的量子需要量(即量子产率的倒数)的测定,认为确实是在8至12左右。这是由于经过光系统所迸出的电子发生了循环,有回到两个光合系统之间的电子传递链之可能,而没有转移给NADP所致,则产生1个O_2分子会多消耗光量子,引起量子的需要量超过8。

B. Kok认为,反应中心可有S_0、S_1、S_2、S_3、S_4五个不同的的氧化状态,且形成$S_0 \rightarrow S_1$、$S_1 \rightarrow S_2$、$S_2 \rightarrow S_3$、$S_3 \rightarrow S_4$四对光化反应过程,每对反应过程均需吸收1个光量子$h\nu$,每步都能激发而移出1个电子,当系统变为S_4时,反应中心每经一次这样的循环便能释放1个O_2。藻类细胞在光照前的黑暗期间,可以松弛而从S_0变为S_1状态,所以第一次释放的O_2峰值是在第三次闪光照射时出现的。不过,经过许多次闪光后的产氧量会趋于一水平,其原因尚未研究清楚,是否在闪光照射的光合过程中,对于许多反应中心来说,逐渐由于不同步而呈现五个不同的氧化状态,其参差趋于最可几混杂之故,有待进一步探讨。

在pH=7的情况下,反应$4H^+ + 4e^- + O_2 \longrightarrow 2H_2O$的还原电极电位为+0.82V,而由$P680^+$产生的次级氧化剂有足够的强度将$H_2O$氧化,其反应$P680^+ + e^- \longrightarrow P680$的还原电极电位显然大于+0.8V。为什么$P680^+$能成为如此强的氧化剂,现在也尚未弄清。从水分子夺取电子的氧化剂是何种物质还不了解。通过ESR检测信号的解析,发现有一种以D为代号的电子供体(见图4-17),但不知道它是什么物质。如今只了解到那氧化剂是一种由某些蛋白质与几个锰原子所组成的复合物。在叶绿体中的每一个P680约含有4当量锰,它在O_2的释放过程中也起作用,如果抽提而除掉1个或更多

个，即将引起 O_2 不能释放。

(二)CO_2 的固定

M.Calvin 等在 20 世纪 50 年代初，使用放射性示踪物 $^{14}CO_2$ 进行一系列的实验，即将藻类于 $^{14}CO_2$ 存在下进行光照射，并迅速捣碎其细胞，找到了最早标有 ^{14}C 的有机物质是 3-磷酸甘油酸，还发现 ^{14}C 几乎都处于羰基中。M.Calvin 等在打开或关闭灯光，或者突然升高或降低 CO_2 浓度的情况下，观察其它化合物稳态浓度的改变，又发现 1 分子 CO_2 和 1 分子核酮糖-1，5-二磷酸在叶绿体基质部分中的二磷酸羧化酶的催化下，生成 2 分子 3-磷酸甘油酸。此外，他们的研究还表明，3-磷酸甘油酸在基质中的其它一些酶(例如醛缩酶、转酮醇酶和异构酶等)作用下，可以变回而生成核酮糖-1，5-二磷酸，组成还原性戊糖循环。

还原性戊糖循环或称 Calvin 循环，其中的一些反应叙述如下：3-磷酸甘油酸被 ATP 磷酸化为 1，3-二磷酸甘油酸后，又被 NADPH 还原成 3-磷酸甘油醛；3-磷酸甘油醛和它转变的异构物磷酸二羟丙酮在醛缩酶的作用下合成果糖-1，6-二磷酸，然后经水解而得果糖-6-磷酸，此水解物在硫胺焦磷酸参与下和另一分子 3-磷酸甘油醛结合而形成木酮糖-5-磷酸和赤藓糖-4-磷酸；赤藓糖-4-磷酸又在醛缩酶催化下与磷酸二羟丙酮结合成景天庚酮糖-1，7-二磷酸，随后再水解而得景天庚酮糖-7-磷酸；该景天庚酮糖-7-磷酸在转酮醇酶作用下又与 3-磷酸甘油醛反应而生成核酮糖-5-磷酸和第二个分子的木酮糖-5-磷酸后，经异构化而成为核酮糖-5-磷酸，然后核酮糖-5-磷酸再接受 ATP 的磷酸化作用而形成核酮糖-1，5-二磷酸，从而完成了一个循环，参见图 4-21。

在循环中每 3 个分子核酮糖-1，5-二磷酸被 CO_2 羧化便有 3 分子核酮糖-1，5-二磷酸再生。在整个过程中，固定了 3 分子 CO_2 而获得 1 分子 3-磷酸甘油醛，但有 9 分子 ATP 转 ADP，还有 6 分子 NADPH 被氧化成 $NADP^+$。生成的 3-磷酸甘油酸(C_3 糖)从叶绿体中排出，或在叶绿体中转化为己糖，并以淀粉形式贮藏。

CO_2 和核酮糖-1,5-二磷酸反应,形成了 3-磷酸甘油酸而将 CO_2 固定,在此过程中核酮糖二磷酸羧化酶起着催化作用。该酶是世界上最丰富的,它在植物叶子中常占其可溶性蛋白的 50% 以上,在高等植物和某些细菌中它含有 8 个相对分子质量(它的旧称是分子量)为 70000 的原体,每个原体含 1 个相对分子质量为 56000 的大亚基和 1 个相对分子质量为 14000 的小亚基。在叶绿体 DNA 指令下,植物中这种酶的大亚基和小亚基分别在叶绿体核糖体与细胞质核糖体上合成,而合成的小亚基务必输送至叶绿体中方能再装配为完整的酶。如果小亚基不存 在,大亚基也有催化活力。此外,在可能是与氨基甲酸化合物羧基端结合的 Mg^{2+} 作用下,底物 CO_2 尚与大亚基上赖氨酸残基的 ε-氨基结合,形成了氨基甲酸化合物(Lysine-NH-CO_2^-),从而促使核酮糖二磷酸羧化酶活化。

从研究中发现,在核酮糖二磷酸羧化酶的催化下,核酮糖-1,5-二磷酸也能与 O_2 反应,这种所谓氧合反应的光呼吸作用使该酶的研究课题变复杂化了。此光呼吸作用的氧合反应产物是 3-磷酸甘油酸和 1 个称磷酸乙醇酸的二碳酸物,且在过氧化物酶体中的酶参与下进行一系列反应过程中,磷酸乙醇酸被 O_2 氧化成 CO_2。在有些植物中约有 1/3 被固定的 CO_2 因光呼吸作用而重新释放。在核酮糖二磷酸羧化酶/氧合酶的催化过程中,CO_2 和 O_2 的竞争性反应随着这二种气体浓度而变化。在此情况下,CO_2 的米氏常数 K_M 约为 20μmol/L,而 O_2 约为 200μmol/L,可见 CO_2 是优先的底物,但在光照射的叶绿体中,O_2 浓度会由于光合作用中 H_2O 的裂解而升高,同时 CO_2 的浓度却因形成糖而降得很低。通常,O_2 与 CO_2 的浓度与 K_M 的数量级相当,于是氧气成为重要的竞争底物。

植物中有些种类的进化(或改良),形成了一种羧化反应比氧合反应更为有利的情况,即让酶所在区的 CO_2 浓度有所增加。例如玉米、甘蔗和许多热带植物等的叶子外表面有一层特化的叶肉细胞,它可通过磷酸烯醇式丙酮酸的羧化从空气中获得 CO_2 而生成草酰乙酸(参见图 4-22)。草酰乙酸还原成苹果酸,并从叶肉细胞迁移至叶

图 4-21 还原性戊糖循环(Calvin 循环)

图中每步反应中箭头尾线的数目是指 3 分子 CO_2 进入循环后，通过该反应的分子数。并以右方框表示净形成 1 分子 3-磷酸甘油醛。

子内部包裹着维管结构的维管束鞘细胞，苹果酸便在此与 NADP 进

行氧化还原的电子转移反应，于是它脱羧形成了丙酮酸，而 $NADP^+$ 被还原成 NADPH。丙酮酸又可再回到这特化的叶肉细胞，并在此由 ATP 裂解成 AMP 和焦磷酸，以及焦磷酸水解等反应提供的自由能所驱动，丙酮酸产生了羧化反应而生成磷酸烯醇式丙酮酸。

以上讨论的辅助循环，由于有四碳酸即苹果酸和草酰乙酸参加，故被称为 C-4 循环。它的代谢途径是：由 2 个高能磷酸键断裂所提供的自由能做功，将 CO_2 和 NADPH 输送至维管束鞘细胞，经核酮糖磷酸羧化酶的催化反应和还原戊糖途径而把 CO_2 固定。在有些种类的植物中，草酰乙酸被转氨而形成天冬氨酸，显然此时被输送至维管束鞘细胞的是天冬氨酸。具有此机制浓缩 CO_2 的植物之生长会比没有这种机制的快得多，尤其在热和阳光充足的气候条件下更是如此。如果利用遗传工程技术将 C-4 循环引入缺乏此途径的植物中，这对于继续提高农业产量也将成为可能，此类研究课题已引起人们的重视。

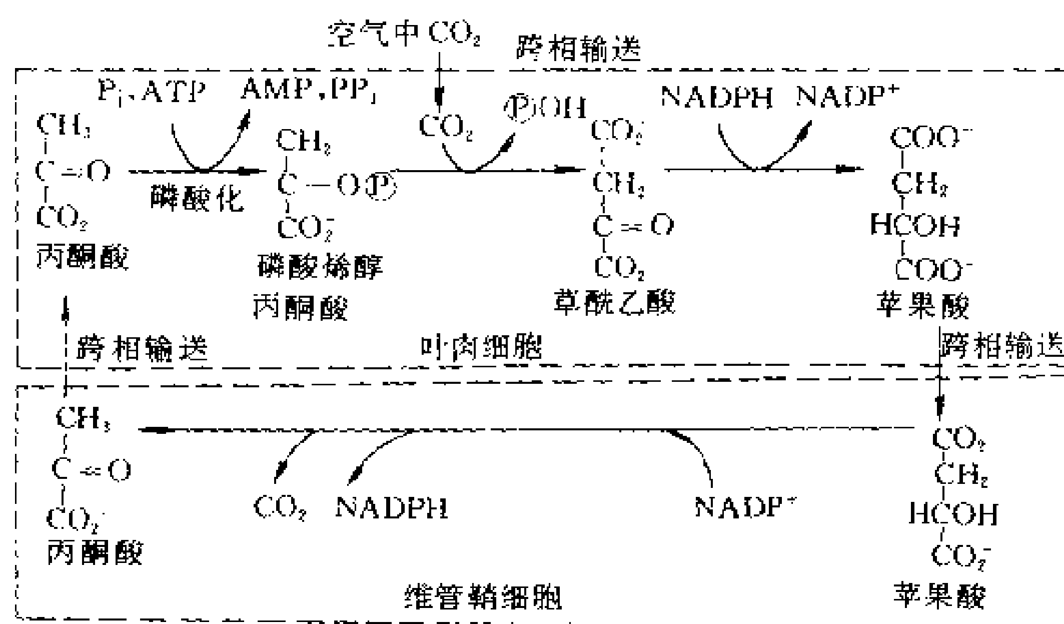


图 4-22　叶肉细胞和维管鞘细胞的协同作用形成 C-4 循环途径

结 束 语

综上所述,电子转移反应不仅在生物体内存在,而且与生命活动紧密相关,可见了解和掌握这方面的知识是必要的。

可以设想,生物体内的电子转移反应与电子传递链(有的是质子传递体系,Na^+—K^+传送体系等)还有可能随着新陈代谢过程将外界给予的信息,通过细胞膜电势和生物电流传至神经系统,即参与起着生物传感的作用。它们分别在生物体适当部位,对光、热、音响、触压能够各自分别作出相应的应答。例如,光传递的图像通过视觉器官的电子传递链体系传至脑膜记录。

一个有意义的实验是:利用一根粗神经轴突(axon)或一种肌肉组织,浸渍在组成接近相同于人体内的盐溶液中,插入两支参考电极(如甘汞电极),一支带有≤10 微米的毛细管插入组织内部,另一支与外部溶液相通,通常可测得 60~110 毫伏的电位差,膜外相对更正些。当对膜外施加短暂的电流脉冲(有些神经细胞对光、压力、温度、某些药物等也很敏感)时,即可测得电势的瞬间变化,如果沿轴突装配数个测量电极,便可测得电势变化的尖峰信号沿轴突移动的速度约为 10~100 米/秒,其值与轴突的种类有关。由于膜受信号扰动部分与其它处于静态部分之间引起电位差,导致形成一连串沿轴突移动的电化学局部电池,于是推定它所产生的电流通过感受体神经细胞将信息传送至大脑。这表明电子转移反应和电子传递链参与传感作用的设想,与实验所观察到的现象及其推定是吻合的。

由上可知,在电子转移反应与电子传递链体系中,若有一环节因病毒侵袭或毒物中毒,或者受到不可逆抑制剂的抑制,或遗传缺陷,就会失去这方面的应答能力,从而引起某种程度的残疾。不过,有关这方面分子水平的机理尚不很清楚,是一值得有待进一步研究的领域。现在人们已开发出脑电图、心电图和 B 超电传感等技术,应用于医学诊断方面。

第五章　生 物 膜

一切细胞均由保持细胞系统完整的质膜围护着,质膜起着维持细胞整体地实现生存所需的基本功能和内部环境的物理化学作用。细胞中物质的新陈代谢与细胞繁殖、摄取营养和能量、ATP 的生物合成、处理与排泄有害物质或废物、与环境中成分的相互作用,以及细胞活动(例如生长与分化的长期过程与感觉的短期活动)等,尚有它们的协调作用,都涉及生物膜组成、结构、装配和功能所产生的作用机制。研究和揭开这类奥秘是生物化学家和生物物理学家的主要任务,也是生物物理化学领域的重要课题。

在细菌等低等生物中主要是细胞膜,即上述的质膜,但在高等生物中除了质膜外,还有将细胞内划分成各种亚细胞器的膜。这些膜有基本相同的组成、结构和性质,统称之为生物膜。它们担负着与生命活动攸关的功能。

5.1　生物膜的组成

5.1.1　真核细胞及其膜组成

在绝大多数真核细胞内,均含有许多结构与功能很不相同的细胞器,这些细胞器在新陈代谢过程中发挥各自特有功能时,都有其本身的膜系统参与。各种细胞器的特有功能诸如细胞内核酸进行生物合成时有核膜参与,分泌与高尔基体和内质网有关,消化与溶酶体有关,光合作用与叶绿体有关,线粒体的呼吸过程有内外膜参与,真核细胞内的每一过程均是在膜隔离的结构域空间中进行的。但是典型的原核细胞如细菌缺少了专门的细胞器,它全是在质膜上发挥其所有的功能,新陈代谢的每一过程是在膜系统一空间区域内进行的。

因此,探讨生物膜的组成、结构、装配和功能便成为生物物理化学者的重大而艰巨的任务。

真核细胞不仅有细胞质膜,而且每种特异的细胞器都被各自特有的膜系统包围着。由于几个不同膜系统的存在使生物膜的组成和结构等的研究复杂化了。现已分离测定了大鼠肝细胞的组成,其各种数据列于表 5-1。

表 5-1 大鼠肝细胞的组成

细胞器	细胞蛋白质百分含量	直径(μm)[密度*(g/ml)]	细胞器特有的标志酶	膜	
				蛋白质与脂质近似重量比	胆固醇与其它脂质近似摩尔比
肝细胞	100	20[1.20]	—		
肝细胞质膜	2	—[1.15]	Na^+—K^+—ATP 酶,病毒受体	1.0	0.40
内质网(小泡)	20	0.1[1.15]	细胞色素 b_5 及其还原酶;葡萄糖-6-磷酸酶	1.0	0.06
高尔基器	2	2[1.10]	糖基转移酶	0.7	0.08
线粒体	25	1[1.20]	(外层膜)单胺氧化酶;	1.0(外膜)	0.05
			(内层膜)细胞色素 c	3.0(内膜)	0.03
溶酶体	2	0.5[1.20]	酸性磷酸酯酶	3.0	0.16
核	15	5~10[1.32]	DNA 聚合酶	3.0	0.11
可溶性蛋白	30	<0.01[—]	—	—	—

* 指在蔗糖中的平衡密度

典型的生物膜是由脂质、蛋白质和碳水化合物等组成的。在不同生物体中膜的组分比例是有差异的,例如:人红细胞质膜中的脂质占 43%左右,蛋白质约占 49%,碳水化合物是 8%左右;髓磷脂中的脂质约有 79%左右,蛋白质占 18%,碳水化合物约含 3%左右;阿米

巴细胞质膜的脂质是 42%，蛋白质约占 54%，碳水化合物的含量约为 4%左右；嗜盐菌的紫膜中有脂质 25%左右、蛋白质约 75%、碳水化合物为零(可能是未能分离出来)。其中的碳水化合物几乎均与蛋白质或脂质共价结合在一起，形成了糖蛋白或糖脂和脂多糖。可以认为，膜是由脂－蛋白质基质组成的，但蛋白质的种类很多，它们各自发挥其特有功能(如特异的通透性，电子传递性，特异的催化性能等。)，而维护膜结构的完整性和通透屏障的任务是由膜脂完成的。

5.1.2 真核细胞膜的分离

为了研究生物膜的组成和结构，首先必须在保持亚细胞器完整的条件下破碎质膜，并从细胞中分离出尽可能多的完整膜。常用的一种方法是在低渗溶液中温和匀浆，即利用细胞在低渗溶液中胀破；另一种方法是将氮气压入细胞中，继而突然间迅速地卸压以爆破细胞膜。然后根据分子大小采用差速离心法而从破裂的细胞中分离开各细胞器(图 5-1(a))；如果要将破碎的细胞质膜自破裂细胞混合物中纯化，可以根据破碎质膜由于脂含量高，相对于完整的细胞器具有较低密度的特点，用平衡密度梯度(等密度)离心法把样品送入一预制的溶质(如蔗糖)梯度中，当达到平衡时，能在相应密度区域中找到各类膜或细胞器(图 5-1(b))。

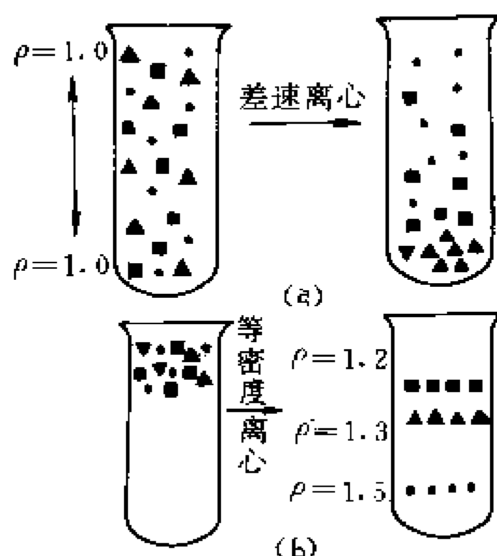


图 5-1 (a)差速离心(根据大小)和 (b)等密度离心(根据密度)

合成的蔗糖聚合物(Ficoll)或胶体硅颗粒(Percoll)可形成较稳定的梯度，且呈现惰性，对生物膜不会渗透，将它们制成的密度梯度，已用于等密度离心法分离破碎细胞中的这些物质。细胞器在蔗糖密度梯度中的沉降性质与其本身大小无关，而与它们的密度有关，密度又取决于它们的化学成分(核酸 $\rho\sim1.7$，蛋白质 $\rho\sim1.25$，脂质 $\rho=0.9$

~1.1)。于是,核相对地具有较高的密度,而脂质含量较高的高尔基体为低密度。如果细胞器能被分离出来,那么它们的膜也就可以分离获得。

通过分离和测定真核细胞中的各种细胞器,发现每一种细胞器各含一些特有的酶,并具有专一性功能。对于被单一膜包围的细胞器,可用低渗缓冲液(渗透休克)处理,再经离心,从细胞器内的可溶性蛋白质中分离出可供研究膜组成的物质。对于具有双层膜的核和线粒体,必须采用适当的表面活性剂进行处理,以便选择性地增溶外膜,从而得到纯化的完整内膜,方能研究它们的物理和化学性质以及各自的功能。这一方法在细胞器膜内脂质和蛋白质含量的精细分析方面已经使用,从而建立了研究各种不同膜系统的结构和功能的实验体系。

5.1.3 细菌的细胞膜组成

大多数的原核细胞是由一层坚硬而颇为复杂的细胞壁保护着,这类细菌能在低渗环境中生活,其细胞壁不会胀破,并保持细菌原有形状,如杆状、球状或螺旋状。

根据 Christian Gram 的染色法,可以将细菌分为两类:一类是以结晶紫-碘染色液染色后,经乙醇清洗时会失去其颜色,称革兰氏阴性;另一类是以乙醇清洗后依然保留着结晶紫-碘染料复合物的颜色,称革兰氏阳性。这已成为细菌分类和显微镜鉴定的一种有用手段。染色性质的不同与革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌的细胞壁组分与结构相异有关,也是膜反应不同所引起的。

由 150000 倍电子显微镜照片可以观察到,革兰氏阳性细胞有一层质膜和一层厚的细胞壁。根据分析的结果,细胞壁是由糖-氨基酸杂聚物(肽聚糖片段见图 5-2 二维示意)或称磷壁(酸)质的多元醇磷酸多聚物(见G. Zubay《生物化学》著作)组成的。细菌肽聚糖 G. Zubay 是由 N-乙酰葡糖胺(GlcNAc)和 N-乙酰胞壁酸(MurNAc)重复交替联结成的链,再由连接在 N-乙酰胞壁酸上的四肽,通过其 D-丙氨酸残基(Ala)和二氨基庚二酸残基(DAP)形成酰胺键交联起来,

但某些四肽并非尽是如图 5-2 这样连接的。革兰氏阳性细菌由于细

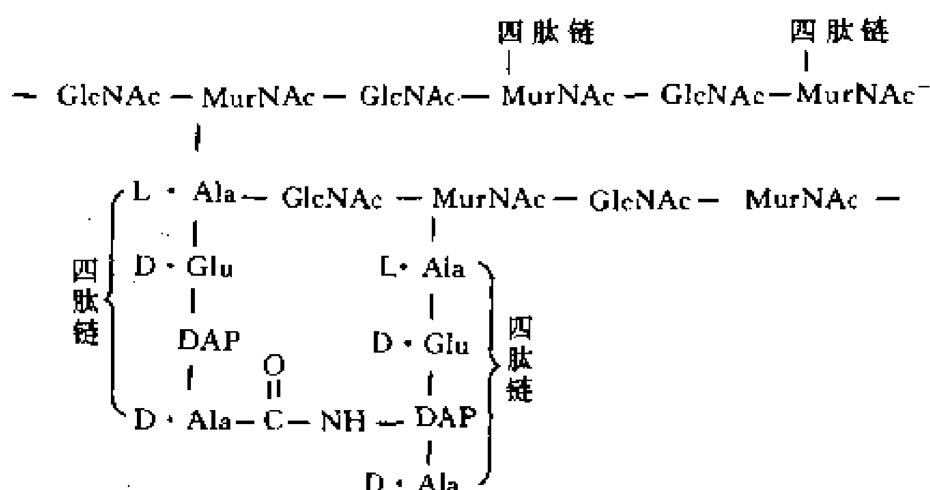


图 5-2 细菌肽聚糖片段网状结构二维示意

(Glu 代表谷氨酸)

胞仅被一层单一膜包围,它的蛋白质组分往往较简单,细胞质膜蛋白和可溶性蛋白的功能类似于革兰氏阴性细菌,大分子水解酶会分泌到细胞外培养基中,从外界分解和吸取营养物。

革兰氏阴性细菌有一层非常薄的细胞壁,它是由肽聚糖和结合蛋白组成的,外面又被脂质和脂多糖以及蛋白质所组成的膜包围,在内层壁膜和外层膜之间的间隙空间中还含有各种功能的蛋白质。为了研究其各层膜的组成和功能,已成功地应用可水解肽聚糖的溶菌酶和能使外膜不稳定的 EDTA(乙二胺四乙酸),在等渗蔗糖溶液中分离了这些膜,并将膜间隙蛋白释放出来,再经沉淀而与原生质体分开。球状原生质体是因其肽聚糖细胞壁已被消化而失去在原细胞内任何非球状特征所形成的,随后用超声波破碎其外膜和内膜,而膜碎片各自迅速地围集,重新封闭成球状小泡壁(图 5-3)。由外膜碎片所形成的小泡含碳水化合物的量较高,故其密度比内膜形成的小泡密度大,于是采用等密度蔗糖梯度离心,可将其各自分开。

应用上述的一些分离技术和逐项分析研究,已认为电子传递链、ATP 合成酶、许多传送蛋白和其它的酶是位于革兰氏阴性细菌的细

胞质膜上,噬菌体与细菌素的隐匿受体和一些传送蛋白以及各种磷脂酶是位于外膜上。两膜间隙中含有参与跨膜传送蛋白、趋化性的营养结合蛋白与各种水解酶。革兰氏阴性细菌中的蛋白质分布概况见表5-2。

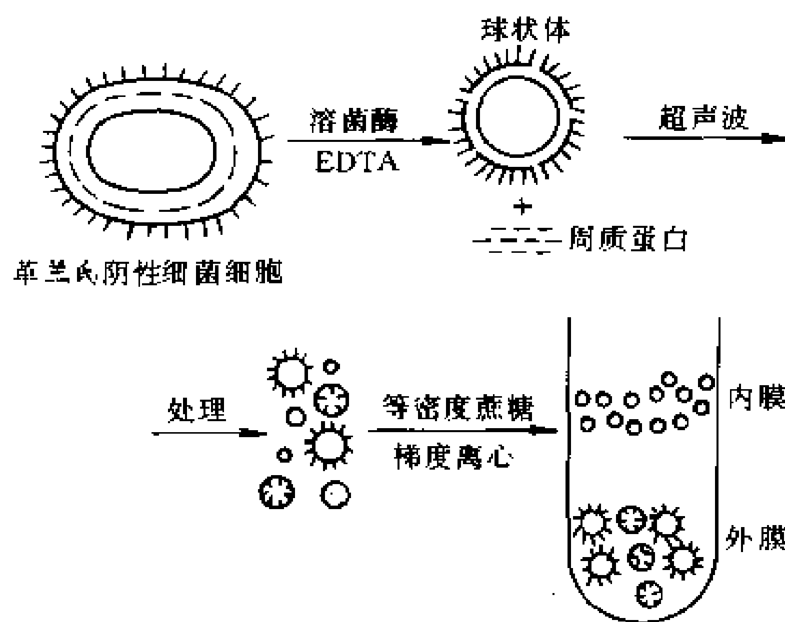


图5-3 革兰氏阴性细菌的细胞周质、内膜和外膜的分离

表5-2 革兰氏阴性细菌中蛋白质在亚细胞器的定位分布

细胞外	内层细胞质膜
蛋白酶	电子传递链
脂肪酶	质子-移位 ATP 酶
糖酶	某些传送蛋白
核酸酶	脂质和细胞被膜生物合成酶
外层脂多糖膜	细胞质
病毒和杀菌剂的受体蛋白	催化可溶性底物合成和降解的酶
磷脂酶A和溶血磷脂酶	DNA
周质	RNA
参与跨膜传送与趋药性的溶质-结合蛋白	核糖体
磷脂酶和酯酶	参与DNA复制、转录、翻译等的酶

5.2 膜脂组分的结构

上述介绍的各种方法所分离而获得的膜,通常可用氯仿、甲醇等有机溶剂处理,能将脂质和蛋白质分开而分别抽提,通过生物化学方法分析膜组分中的脂质和蛋白质含量。

5.2.1 膜脂组成

生物膜主要是由脂类物质和蛋白质组成的,二者在大多数膜中的重量比为1∶4～4∶1,膜中还包含糖,是以糖脂和糖蛋白的形式存在。

构成膜的脂类物质有磷脂、糖脂和胆固醇三类,最常见的脂类物质是其中的磷脂,是一含有磷酸基的脂类。磷脂可分为甘油磷脂和鞘磷脂,它们具有与膜结构和功能有关的性质。

甘油磷脂是磷脂中数量最多的结构物,均含有一个甘油-3-磷酸主链,并由此链的甘油分子碳1位和碳2位羟基通过脂肪酸酰基化形成的(见G. Zubay《生物化学》)。生物膜中磷脂酸的磷酸基上被各种化合物取代,从而构成了大多数的磷酸甘油脂,例如磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇和磷脂酰胆碱(又称卵磷脂)。磷脂酰甘油的甘油碳1位和碳2位的羟基还可以被另一分子磷脂酸酰基化,生成生物膜中另一常见的磷酸甘油脂,称为二磷脂酰甘油(或称心磷脂)。在神经细胞膜和肌肉细胞膜中尚含有相当多的缩醛磷脂 $[R_1CH{=}CH{-}O{-}CH_2CH(-O\overset{O}{\overset{\|}{C}}R_2)CH_2{-}O{-}\overset{O^-}{\overset{|}{P}}({=}O){-}CH_2CH_2\overset{+}{N}H_3]$,它有一长链的 α-β 不饱和烯烃基团。

在高等动物尤其在神经组织中占重要组分的神经鞘磷脂是第二种含磷的脂质,它由一种氨基醇(称鞘氨醇)通过酰胺键连接脂肪酸,形成神经酰胺,并在神经酰胺的1-羟基处与磷酸乙醇胺或磷酸胆碱发生酰化而形成的。

在任何磷酸甘油脂或神经鞘磷脂中均能分离到各种脂肪酸的混

合物，可以发现磷酸甘油脂的甘油碳1位有一个饱和脂肪酸，而碳2位含有一个不饱和脂肪酸（在细菌内是环丙烷脂肪酸），例如牛卵磷脂或乳杆菌中一常见的成分（见G.Zubay《生物化学》）。测定自生物源来的各种磷脂之脂肪酸成分，结果表明，由于磷脂的多样化而所获得的脂肪酸也是多样的，除环丙烷脂肪酸外，生物内磷脂的脂肪酸几乎都是14～24的偶数碳原子脂肪酸，例外的有某些海洋生物含大量奇数碳原子脂肪酸。大多数细菌内的磷脂只含1个不饱和脂肪酸，其它生物的磷脂中所含不饱和脂肪酸或许有1、2、3、4个双键，而它们几乎都是顺式结构。

第二类脂质是由鞘糖脂组成的一些化合物，它们是神经细胞膜和肌肉细胞膜的重要成分。这些糖脂是由1个或几个糖残基以β-糖苷键与神经酰胺1位的羟基连接而衍生的。由单一的葡萄糖基或半乳糖基连接的分子称为脑苷脂（见G.Zubay《生物化学》）。脑和神经系统中含有很丰富的半乳糖脑苷脂。另一种脑硫（苷）脂是可能在半乳糖基的3位羟基被硫酸酯化而产生的。神经节苷脂是更复杂的一种鞘糖脂，它含有3个或更多的糖残基并连接在神经酰胺骨架上，还至少有1个唾液酸残基，它存在于神经末端膜上（尤其在脑中），可能起着神经刺激传递的重要作用。它的分子结构式见G.Zubay主编的《生物化学》。

多糖脂似乎是只限于革兰氏阴性类细菌外膜中的组分，通常，它含碳水化合物的重量比脂质高，但由于它的脂肪酰链是细菌外层膜结构的内嵌部分，人们往往将它归入膜脂类。它具有O抗原的末端碳水化合物链能伸展到细胞表面（参见图5-4），因而赋于细菌呈现特征抗原性。多糖脂又是内毒素的主要成分，而革兰氏阴性细菌溶菌时所释放的内毒素是致病发烧的物质。

甾类是生物膜上另一类脂，类异戊二烯或萜类是生物合成它们的前体。在生物膜上发现的一些较重要的萜类有：最常见的膜甾类——胆固醇存在于动物细胞膜和少数微生物中；11-顺视黄醛是脊椎动物视网膜上维生素A的衍生物；植醇是叶绿素的一种成分；11-异

戊二烯醇(或细菌萜醇)是细菌细胞壁生物合成中的一种重要辅酶;泛醌(或辅酶 Q)具有在线粒体内膜上作为氢载体的功能。此外,甾体是血浆中某些脂蛋白的常见成分。

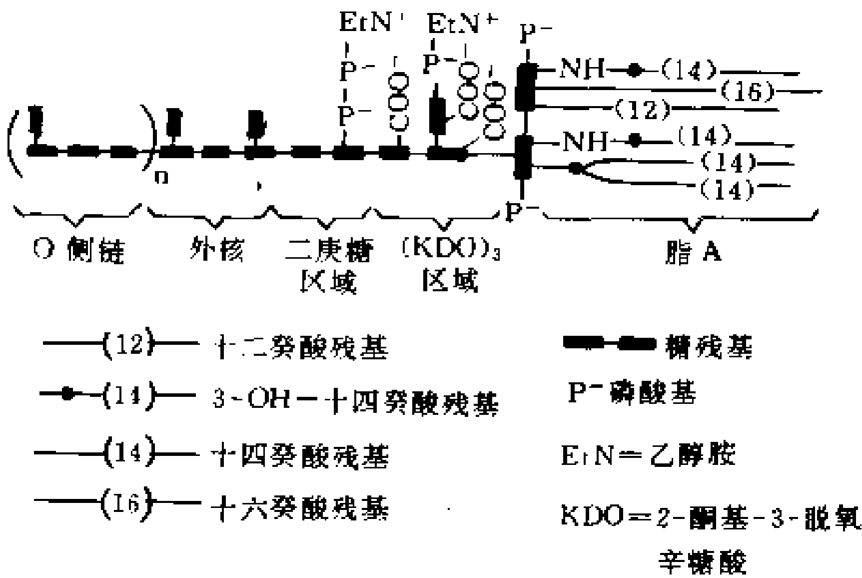


图 5-4　鼠伤寒菌外膜多糖脂结构示意

几种生物膜脂质的成分见表 5-3。可以发现:动物细胞膜的主要磷脂成分是磷脂酰胆碱,而细菌中以磷脂酰乙醇胺为主;在原核生物的细胞膜上,鞘磷脂和糖脂通常都不存在,例外的有胆固醇和多糖脂;表中所提及的大多数生物膜通过电子显微镜观察,发现其外观具有独特的三层,它们的脂质成分变化很大,人们由此推测,膜脂是以其相似的性质和相似的方式对生物膜特有结构作出贡献的。

表 5-3　几种膜的制剂中脂质成分

制剂来源	脂质成分(百分比)									
	胆固醇	PC	SM	PE	PI	PS	PG	DPG	PA	糖脂
大鼠肝										
细胞质膜	0.0	18	14.0	11	4.0	9.0	—	—	1	—
内质网(粗糙)	6.0	55	3.0	16	8.0	3.0	—	—	—	—
内质网(光滑)	10.0	55	12.0	21	6.7	—	—	1.9	—	—

续 表

制剂来源	脂质成分(百分比)									
	胆固醇	PC	SM	PE	PI	PS	PG	DPG	PA	糖脂
线粒体(内层)	3.0	45	2.5	25	6.0	1.0	2.0	18	0.7	—
线粒体(外层)	5.0	50	5.0	23	13.0	2.0	2.5	3.5	1.3	—
核膜	10.0	55	3.0	20	7.0	3.0	—	—	1.0	—
高尔基体	7.5	40	10.0	15	6.0	3.5	—	—	—	—
溶酶体	14.0	25	24.0	13	7.0	—	—	5.0	—	—
大鼠脑										
髓磷脂	22.0	11	6.0	14	—	7.0	—	—	—	21
突触体	20.0	24	3.5	20	2.0	8.0	—	—	1.0	—
大鼠红血球	24.0	31	8.5	15	2.2	7.0	—	—	0.1	3
大鼠棒状体细胞(外层片段)	3.0	41	-	37	2.0	13.0	—	—	—	—
大肠杆菌细胞质膜	0	0	—	80	—	—	15.0	5.0	—	—
巨大芽孢芽孢杆菌细胞质膜	0	0	—	69	—	—	30.0	1.0	—	微量

注:PC=磷脂酰胆碱,SM=鞘磷脂,PE=磷脂酰乙醇胺,PI=磷脂酰肌醇,
PS=磷脂酰丝氨酸,PG=磷脂酰甘油,DPG=二磷脂酰甘油(心磷脂),
PA=磷脂酸

5.2.2 膜脂在膜中的有序结构

上述膜脂均有一个类似表面活性剂的共同特征,即分子中不仅含有亲水基团,而且又有疏水基团。例如磷脂类,它们就是由长的疏水"尾部"脂肪酰链和一个以磷酸基团与醇酯化而形成的极性亲水"头部"基团所组成的,称为亲水疏水的双亲(媒)分子。当 pH 为中性时,极性头部基团净带一个负电荷(如磷脂酸、磷脂酰甘油、二磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸等),或正电荷(如 O-赖氨酰磷脂酰甘油),或没有净电荷(如磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺)。

糖脂和多糖脂也有碳氢化合物基团的尾部和糖残基的极性头部。胆固醇在化学结构上虽完全不同于含脂肪酸的脂类,但也有疏水和亲水部分。鞘磷脂在化学结构上与磷酸甘油脂大不相同,但在

空间结构模型上似乎与其它磷脂相似。

由于膜脂具有上述的两性性质，则在水溶液中的溶解度很小。例如磷脂分子有大的疏水基团，使其在水溶液中只能以非常少的单体分子形式存在，它们倾向于在水-空气界面形成一层磷脂薄膜。当磷脂为适当少量时，这层薄膜是磷脂单层，以极性头部向水和疏水尾部伸向空气形成有序排列的结构。当溶液中含有颇多的磷脂时，会使其在水-空气界面上饱和而发生磷脂在溶液中的集聚，导致脂肪酰链间的疏水与范德华力的相互作用增至最大限度，尽可能地挤出它们附近的水分子，且极性头部基团向水相与水分子相互作用。相应的各种形式胶束(团粒和双层“小泡”等)结构分布于水溶液中，界面单层膜和胶束结构(参见图5-5)都是相应浓度的磷脂在水溶液中呈现的自发形式，由于它们的存在破坏了围绕磷脂单体疏水碳氢链的水分子之有序排列，故使溶液的熵增加了。

水溶液中磷脂形成的双层球形胶束，其中心包容着水溶液，四周也被水溶液所包围，如此地分布在水溶液中犹似一个个“小泡”，它们没有暴露在水溶液的碳氢尾部，这种结构比平面双层膜更有利。大多数自然界的磷脂在水溶液中更易趋于双层小泡的形成。双层小泡能更有效地包容水溶液，但是缺少一条脂酰链的溶血磷脂、游离的脂肪酸和某些表面活性剂，由于几何形状之故而具有比磷脂更小的疏水表面积，因此形成团粒要比形成双层小泡容易。

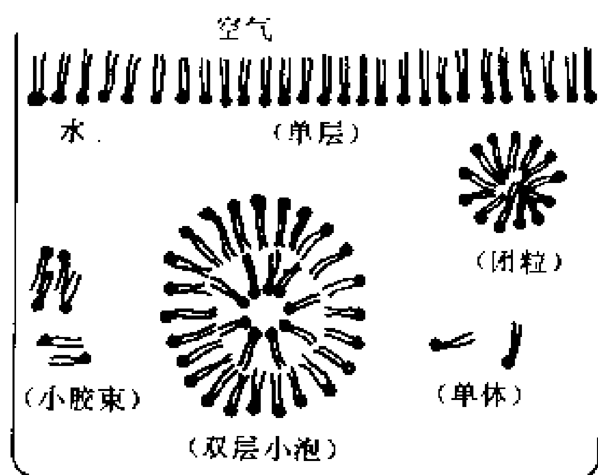


图5-5 磷脂分子在水溶液中形成的结构
每个单体分子由极性头部(黑点)和连接的两条脂肪酰碳氢链(双波线)示意。

生物膜结构与磷脂、糖脂的这些性质紧密相关。这些分子在水

溶液中形成上述的双层小泡结构能使熵增加，而 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ 为负值，因此，该过程是可以自发进行的；细胞基本上是由质膜围成的小泡，由于其它分子结构的影响，则小泡不呈现球形；分散在水中纯化的磷脂，其极性头部基团在双层中排列，从电子显微镜中观察到三层现象，可以证实磷脂双层生物膜在电子显微镜照片中的三层现象；磷脂双层的疏水链造成的中区，对大多数亲水物质是较难于通透的，除非有识别传送系统选择通透某个亲水分子，这也能解释生物膜的特异通透性质。物理化学领域的研究充分证实了脂类在决定生物膜结构方面具有很重要的作用，生物膜的基本骨架是由脂双分子层膜结构构成的。

5.3 生物膜蛋白

5.3.1 膜蛋白的一般性质与提取

除了膜脂是生物膜的重要构成成分，并呈现出生物膜的某些特征功能之外，在任何膜结构中尚须注意到生物膜组分中膜结合蛋白质的存在。参与生物膜组分的蛋白质会显示出膜的其它如传送和酶活性等专一性功能。这种蛋白质现已发现有两种类型：一类称作外周膜蛋白，它们是能用可破坏离子键和氢键的试剂(例如 EDTA、高价盐或尿素等)处理，即可从已分离的膜上脱落；另一类称为内嵌膜蛋白，它们依靠膜脂和蛋白质间的较强疏水相互作用而储藏在膜中间，必须采用有机溶剂或表面活性剂破坏膜脂的疏水相互作用，才能将其从膜上分离出来。外周蛋白很可能是由于与内嵌膜蛋白暴露在膜表面的亲水部分相互作用而与膜结合的。图 5-6 的生物膜基本结构模型是根据生物膜为脂双分子层情况

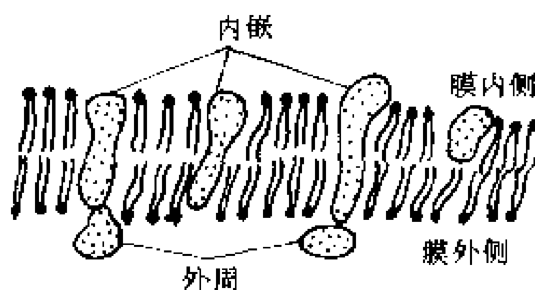
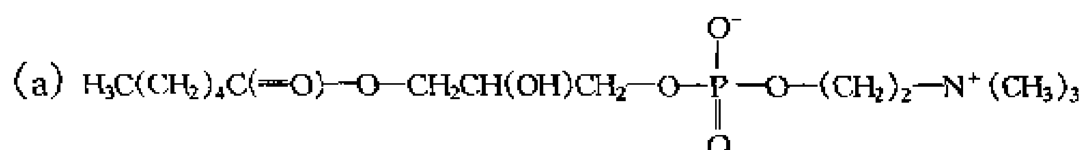


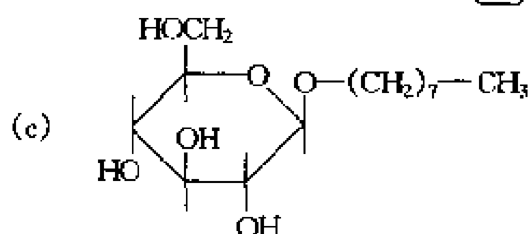
图 5-6 外周膜蛋白和内嵌膜蛋白参与膜组成的示意

下描绘的。

要了解内嵌膜蛋白的物理和化学性质，必须将它们从膜的基质上解离出来，然后纯化而进行测试。通常可以利用有机溶剂或表面活性剂将内嵌蛋白卷离膜基质而进入溶液。表面活性剂可分为天然的和人工合成的两类双亲媒分子，它们既具有能插入膜基质的疏水基团来破坏膜结构并形成胶束，又有溶于水的亲水基团可将蛋白质分子带入水中而增溶脂质和蛋白质成分。天然的表面活性剂有溶血卵磷脂和脱氧胆酸钠(甾类胆汁盐)等，这两种都是离子型的(见 G. Zubay 主编《生物化学》等著作)。合成的表面活性剂有 TritonX-100 (即吐温-100)和辛基葡萄糖苷，它们都是非离子型的；离子型的有十六烷基三甲基胺溴化物和十二烷基硫酸钠(SDS)。十二烷基硫酸钠是一种有效的蛋白质变性剂。许多表面活性剂都是通过形成表面活性剂-脂质和表面活性剂-脂质-蛋白质等的混合胶束(见图 5-7)来溶解膜中的蛋白质。脱氧胆酸钠、TritonX-100、八酰葡萄糖苷和溴化十六烷基三甲基铵的化学式分别示于如下(a)、(b)、(c)和(d)：









由于上述表面活性剂的特殊几何形状，一般均形成胶束。每种表面活性剂都有一个特征的临界胶束浓度(CMC)，如果溶液中的表面活性剂高于此浓度，便会几乎全部以胶束形式存在于溶液中，当浓度颇高时，胶束即变成团粒结构(参见表 5-4，应考虑到影响 CMC 和

胶束大小的因素很多，例如离子强度和 pH 值等）。每种表面活性剂尚有一特征的亲水-疏水平衡（HLB），HLB 值是在实验基础上获得的经验性值，有多种的确定方法，而分子中亲水部分的相对分子质量（M_H）与疏水部分的相对分子质量（M_O）和亲水部分相对分子质量（M_H）的加和（M_O+M_H）之比乘以 20，即 $20\frac{M_H}{M_O+M_H}$ 就是其中的一种确定方法。这两种性质对于某一特定的表面活性剂在决定膜的增溶方面起着重要的作用。但必须注意同一种表面活性剂往往对不同膜系统的增溶作用有差异。由于离子型表面活性剂易与可溶性蛋白结合，有可能促使膜蛋白中负责催化活性的亲水基团之构象发生变化，所以更易改变它们的生物化学功能。目前还未发现亲水蛋白质与非离子型表面活性剂之间的化学作用。

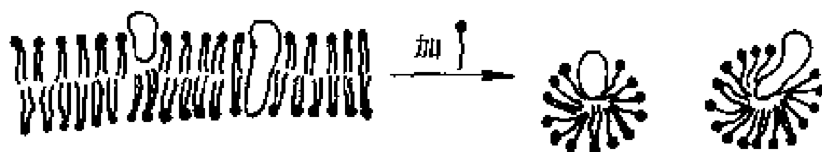


图 5-7 增溶所形成的表面活性剂-脂质-蛋白质混合胶束团粒

内嵌膜蛋白被包裹在表面活性剂-脂质的胶束团粒中，则这种团粒的相对分子质量可达 10^5 或者更大，于是掩盖了各种膜蛋白分子间的大小差异，造成过滤或按分子大小与形状分离蛋白质的方法对膜蛋白的分离往往没有特别用处。如果使用脱氧胆酸和辛基葡萄糖苷等高 CMC 的表面活性剂便有可能按照分子大小的原理分离膜蛋白。非离子型的 Triton X-100 等表面活性剂可用于离子交换层析法来分离溶解的膜蛋白。

表 5-4 膜生物化学中常用的一些表面活性剂性质

表面活性剂	单体相对分子质量	CMC(mmol/L)	团粒平均相对分子质量
非离子型			
Triton X-100	625	0.24	90000
辛基-β-D-葡萄糖苷	292	25	—
离子型			
脱氧胆酸(阴离子)	392	4	800
溶血卵磷脂(混合)	500～600	0.02～0.2	95000
SDS	288	8	17000

表中数据可随测定时条件差异而变化

特别有用的方法是根据蛋白质相对疏水力而设计的疏水相互作用层析，此法采用已共价结合疏水烷基或芳香基的不溶性支持物(如琼脂糖或聚丙烯酰胺)，往往能够使以疏水相互作用力吸附到树脂上的蛋白质可按相互作用力的大小，借助于逐渐改变洗脱缓冲液的疏水力、离子强度、pH或温度而将吸附膜蛋白相继地洗下来，从而达到分离的目的。这种疏水树脂的液体层析柱曾纯化过许多内嵌膜蛋白。

亲和层析是纯化可溶性酶的一种很有效的技术，也已成功地用于许多内嵌膜蛋白的纯化，如对能与专一性代谢物相互作用的传送蛋白进行纯化。硫酸铵和等电点沉淀、等电聚焦以及制备用的胶电泳等在合适的增溶剂存在下，已应用于内嵌膜蛋白的纯化。

5.3.2 膜蛋白的分离、测定和膜上排布

以离子型表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)完全增溶膜之后，即可使用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术测定特定膜的蛋白质成分。这种技术可辨别人类红血球膜中仅十多种蛋白质(参见图 5-8)，也证明了包围某些神经细胞轴突的髓磷脂膜和哺乳动物肌浆网状膜中都含有三种主要蛋白质(特异通透性能、电子传递性能和特异催化性能等的蛋白质)。肌浆网状膜蛋白的含量最丰富，经鉴别它是 Ca^{2+} 移位 ATP 酶。哺乳动物视网膜杆状外层片断的主要蛋白质是视紫红质，它是单一肽链。

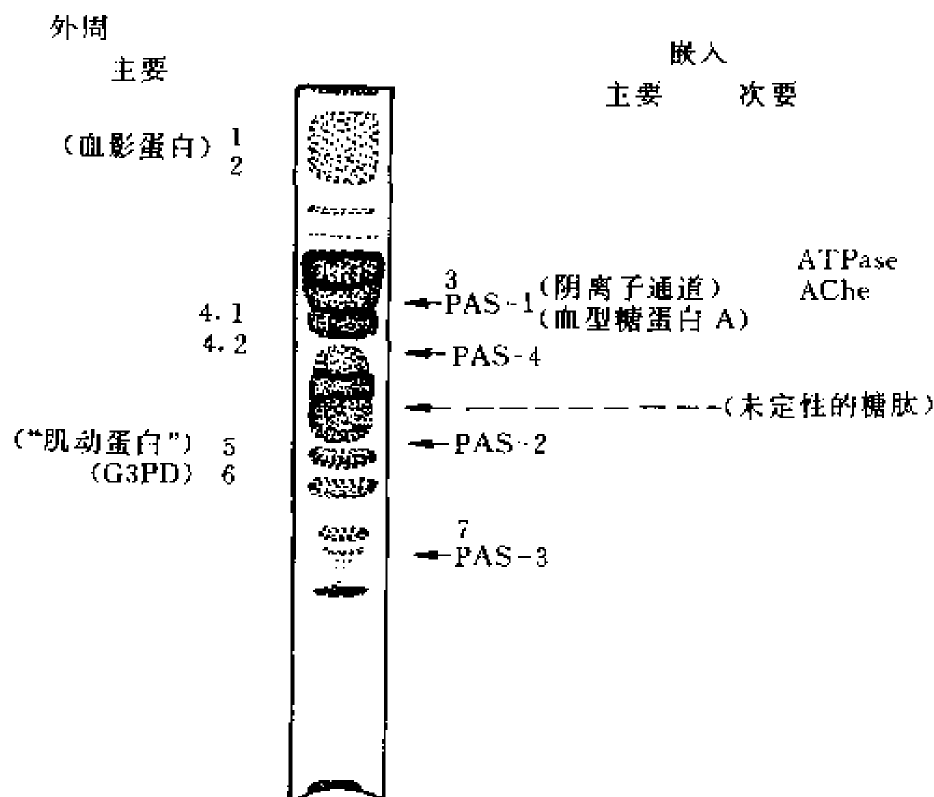


图 5-8 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的人类红血球膜蛋白

由考马斯亮蓝染成色带，编号为 1-7 号，带 3 和 PAS-1 没有完全分离开。PAS-1～PAS-2 为唾液酸糖蛋白(可被一种与碳水化合物反应的试剂重染)

许多已分离的内嵌膜蛋白有一共同的性质，就是通常需要一个疏水环境以维持生物活性结构。如果这些蛋白质周围除去表面活性剂和残余磷脂，往往导致任何酶或其它具有生物活力的物质失活，所以蛋白质从溶液中凝集或沉淀也往往发生失活现象。因此，测定膜蛋白在天然状态下所存在于膜系统的三维结构(即拓扑结构)很有必要，由它可进一步了解蛋白质在生物膜中所起的重要作用。

测定膜蛋白拓扑结构的技术是使用蛋白酶和其它不能透过膜的修饰试剂进行处理，并与氨基酸顺序分析相结合，以确定多肽的哪部分暴露在膜内和膜外两侧，哪一部分是被裹在膜结构的脂质中。若一种膜只含一种蛋白质的少数情况下，就有可能采用电子显微镜技术测定多肽在膜中的分布。

内嵌膜蛋白经实验证实有两种基本类型：一类内嵌膜蛋白是一小部分埋入膜的疏水部位，而其大部分伸向水溶液中，例如在红细胞膜上所发现的两种主要的蛋白质，即唾液酸糖蛋白（血型糖蛋白）和带 3 阴离子传送蛋白；另一类内嵌蛋白，它的多肽链大部分被膜裹在中间，因而难于接近亲水的标记试剂。

血型糖蛋白已从红细胞膜中分离得到，它的相对分子质量约为 31000，且具有细胞 ABO-血型和 MN-血型抗原特征，还成为流感病毒的受体。血型糖蛋白是由蛋白质（占总重量 40%）和碳水化合物（占总重量 60%）组成的，即它有一条肽链，短的碳水化合物链以共价结合在氨基端区域的氨基酸残基上，多肽链的羧基端富含极性氨基酸，分子中糖和亲水氨基酸残基这部分是极性的，而蛋白质链的中段含有一约 20 个氨基酸残基的极为疏水的伸展于膜内部分。标记实验证明富含碳水化合物的氨基端位于红细胞膜外表面，蛋白质分子在这段的蛋白质约占血型糖蛋白总体的 80% 以上，又由于蛋白质的羧基端是暴露在红细胞膜的内侧细胞质中，所以每个血型糖蛋白分子一定是横跨膜配布的。图 5-9 所描绘的模型表明：血型糖蛋白的疏水段因对红细胞膜中两种主要脂质（磷脂和胆固醇）有较大的亲和力，导致其埋入疏水环境中形成一个很稳定的 α 螺旋。这个螺旋长度约 4nm，略短于已知生物膜的厚度。

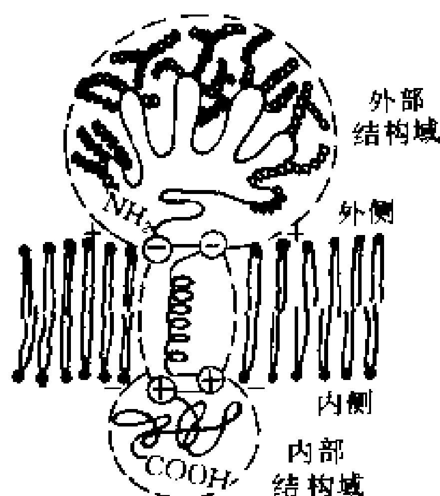


图 5-9 哺乳动物红细胞膜血型糖蛋白拓扑结构

串珠表示糖残基，都位于膜外侧的蛋白质氨基端上（主要和蛋白质的丝氨酸、苏氨酸残基上的羟基结合）

人类红血球膜上另一种具有传送阴离子通道典型特征的内嵌膜蛋白，是十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离中的带 3 蛋白。完整细胞和不封闭的膜血影细胞的标记实验研究，了解到该相对分

子质量约 95000 的糖蛋白也是跨膜的，它在细胞外侧表面含有碳水化合物。糖蛋白有占其分子约三分之一的羧基端，此羧基端和糖蛋白的碳水化合物部分（结合了糖残基的大多数氨基酸）组成的片段，是由膜内伸向细胞膜外侧表面，该片段的相对分子质量约有 38000。然而与血型糖蛋白相反，相对分子质量将近 41000 的多肽片段（包括蛋白质的氨基端）是处在细胞膜内侧的细胞质中。相对分子质量大约有 17000 的片段被证明是完全跨膜的。红细胞膜内的多肽是以二聚体形式存在（参见图 5-10）。伸展至细胞膜外侧的片段至少可被在细胞外侧的试剂标记。根据实验的又一发现，阴离子通道的多肽至少横跨膜三次。

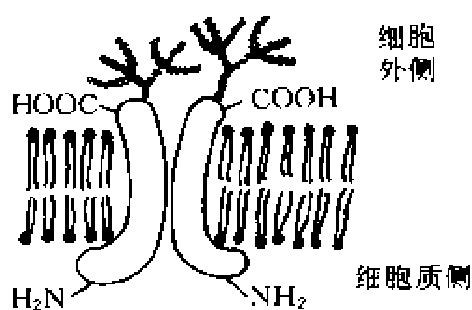


图 5-10　人类红细胞膜阴离子通道蛋白（带 3）在膜上的结构示意

生活在盐沼泽中的嗜盐杆菌，具有一种不常见的生物膜，通称紫膜，是由脂质和仅含一种细菌视紫红质的蛋白质所组成（视紫红质之称是由含类似视觉受体蛋白视紫红质中辅基的视网膜辅基而得名）。这种具有与光反应起着质子泵功能的蛋白质，在厌气条件下生物合成 ATP 有着极其重要的作用。从电子显微镜图和分辨率为 0.7nm 的衍射图案有可能推定出细菌视紫红质蛋白在紫膜平面内形成一个高度规则的六角形格子结构，每个这种蛋白质分子跨膜七次，每一跨膜片段都显示 α 螺旋的结构（图 5-11）。由此可看到细菌视紫红质的大部分片段是裹在膜

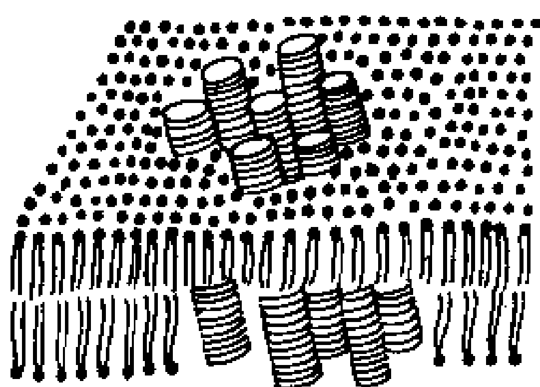


图 5-11　嗜盐细菌紫膜中的单个细菌视紫红质蛋白分子在膜中示意

除顶端和底部外，7 个 α 螺旋片段跨膜垂直于膜平面，并埋在膜脂中，α 螺旋间的联接多肽片段未示出

脂质中，说明这种蛋白质具有高含量的疏水氨基酸。

各种研究表明，膜蛋白通常以折叠方式使高度结构化的蛋白质尽量以疏水基团暴露于表面，促进其也能存在于生物膜内部以疏水为特征的环境中。通过高级电镜技术，得到具有跨膜光驱动质子泵功能的细菌视紫红质蛋白存在于膜内时的三维结构初步图像。含有247个残基的分子肽链排布成7个α-螺旋组成一束，螺旋的长度约4nm足以横跨膜，螺旋的“内侧表面”有着可相互发生作用的带电基团，这样的排布迫使α-螺旋中带电氨基酸侧链以互补形式在蛋白质内部发生作用。螺旋的“外侧表面”以疏水侧链暴露于膜内部的疏水环境中。这种性质与中子衍射测试获得缬氨酸位于螺旋“外表面”的结果是一致的。结论是细菌膜蛋白视紫红质与存在于水极性环境中的球蛋白相比，在结构上正好内外相反。这犹似聚乙烯醇在一定条件下将其分子的亲水羟基向内并与$Cu(OH)_2$作用，呈现以疏水链向外的结构形式，然而在另一些条件下的溶液中却以疏水链向内，以疏水力作用包裹$Cu(OH)_2$而形成透明溶液的相反结构形式。由此间接旁证似乎也能给予解释，说明蛋白质的拓扑结构也有可能进行如此的变换。

根据目前线粒体内膜上电子传递链的拓扑结构的证据表明，有些内嵌膜蛋白并不跨膜，某些位于膜的内表面；一些位于膜的外表面；也有的是处于整个膜结构中。这种排布和当前人们普遍接受的呼吸过程中电子传递和质子泵的模型是一致的。肝内质网膜上具有脂肪酸去饱和功能的电子传递链系统，电子由NADH传给细胞色素b_5还原酶，随后传给细胞色素b_5，再传给去饱和酶，所有这些蛋白质的催化部位都处在内质网的细胞质一侧。测定细胞色素b_5的实验揭示其相对分子质量为16000，它通过一个含有较高比例的疏水性氨基酸残基的多肽片段(相对分子质量有5000)插入膜内，这肽段进入膜后形成一个环，然后又回到原来一侧，它并未穿过膜而使氨基端和羧基端处在内质网的细胞质一侧。

根据以上所述，在生物膜中发现的蛋白质之拓扑结构显然要比

膜脂的拓扑结构复杂得多,变化也多,多肽可以穿过膜,有的也可不穿过膜;相当大的蛋白质片段可突出细胞膜外侧,也可突出在细胞膜内侧;多肽可能含有相当的疏水性氨基酸成分而将此片段埋于膜内;其氨基端可以在细胞的外侧,而它的羧基端却突出在细胞质一侧,对不同的内嵌多肽而言,相反情况也可能存在。这些情况可以概括为如下几点:无论大小,多肽片段都是通过疏水力与膜脂发生强烈的相互作用;在膜内多肽的常见结构是α螺旋;质膜糖蛋白的疏水侧链总是在螺旋的外侧。

5.4 生物膜的结构和性质

在前人的研究中,先后提出了多种的膜结构模型。可是,这些研究者都不具有如今我们所掌握的有关膜脂与膜蛋白的拓扑结构之信息。

5.4.1 膜的流动镶嵌模型

人们现在所接受的膜结构是由J.S.Singer和G.L.Nicolson于1972年提出的流动镶嵌模型,此模型的基本概念认为,膜的基本结构之重复单位是磷脂分子的双层排列(厚度约5nm),而内嵌膜蛋白似乎是以随机的状态处于双层中,某些如线粒体的细胞色素等的蛋白质可能位于脂双层两个表面中的内侧面或外侧面;有些如血型糖蛋白和阴离子通道蛋白等蛋白质可能从膜的一侧穿至另一侧;还有些如细菌视紫红质等蛋白质也许大部分裹埋在疏水区域中。大部分的膜磷脂是以双层排列的,而由于生物膜活性的需要,也有一些磷脂是与特异性内嵌膜蛋白结合在一起。膜的整个结构是动态的而并非是静止的状态,大部分成分都能较迅速地作侧向平移扩散和环绕垂直于脂双层平面的轴作旋转运动。但脂质和蛋白质横跨膜双层平面的旋转运动是很难而极少发生的。图5-12大概地描绘了在某一时间和空间内所设想的生物膜流动镶嵌模型,它体现了生物膜结构的一些已知特征。

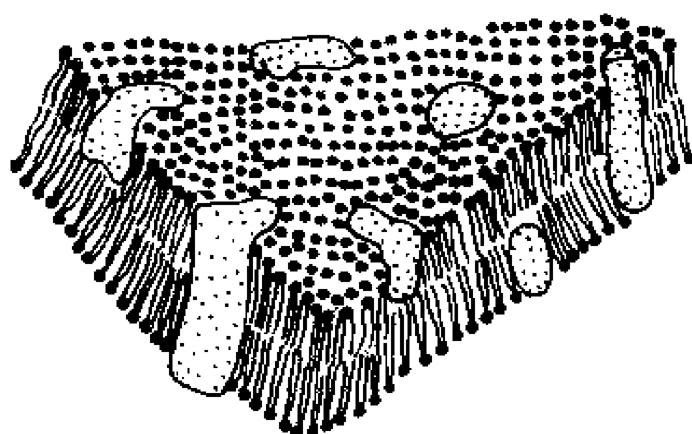


图 5-12 Singer 和 Nicolson 等所设想的流动镶嵌模型

应用低入射角 X 射线束对生物膜的电子衍射物理技术，测定了膜脂双层的结构，显示出膜脂双层两侧的两个衍射峰之间（即膜中心部位）为电子密度的“波谷”（见图 5-13），体现了磷脂和糖脂的碳氢“尾部”比极性头部基团具有更低的电子密度，而且富有电子和缺乏电子区域的面积与纯磷脂在水溶液中形成的膜双层结构对应面积相似。其它物理化学测定的结论与双层结构观点完全一致。可以认为大部分生物膜的最基本结构特征是脂双层拓扑结构，但有例外的。

现已完全确认脂双层是亲水溶质不易越过的通透屏障。只有那些被特异性内嵌蛋白识别的水溶性分子才能容易地透过膜，而这些膜蛋白也只有在与膜双层内膜脂的非极性部分相互作用形成的非水环境中，方能有效地发挥作用。

例如，质子被泵出线粒体的单向膜通透过程，表明跨线粒体内膜的质子载体蛋白在膜中有不对称排布的结构；又如血型糖蛋白和阴离子通道蛋白总是处在细胞内侧和外侧一个方向上。这些事实也表明这种在膜内不对称排布是能够长期存在的。

各种技术充分地证实，膜蛋白的排布是动态的，它与膜脂有平行于脂双层平面进行相互侧向扩散的能力，而内嵌膜蛋白很难发生围绕平行于脂双层之轴进行翻滚的行为。测定侧向扩散的一种比较简单的方法，即荧光光漂白恢复技术。该技术是采用荧光标记膜成分，

然后在膜的一个小区域内经一种短暂而强烈地闪光照射破坏其荧光，进行所谓的荧光光漂白，并通过荧光显微镜观察此区域，以时间作函数可以观察到荧光再次出现，便可得没有光漂白的分子扩散进入这漂白区域的速度。一个特定的荧光标记膜成分在膜平面上的扩散系数就能从荧光出现的时间推算而获得。使用此技术已证实了许多膜蛋白和膜脂所进行的侧向平移运动，例如能够看到脊椎动物视网膜上的一种光受体蛋白视紫红质在脂双层中的一频繁运动，发现各种蛋白质在膜内的扩散系数差异很大。

L.Frye 和 M.Edidin 设计了一个试验蛋白质在生物膜中流动性的著名实验，他们使用了能对小鼠细胞的膜蛋白发出绿色荧光的专一性抗体标记，而对人细胞应用可发红色荧光的专一性抗体标记，且借助于能促进细胞融合的仙台病毒而使小鼠细胞与人细胞融合。如果膜蛋白不会扩散，那么这两种细胞融合的杂核体膜蛋白即使在生理温度（37℃）保温较长时间后，也依然保持红绿标记的分离状态。然而，实验尚未到 30 分钟便可在荧光显微镜下观察到红绿标记混合而交织在一起，在 1 小时内即能在所有杂核体中见到人和小鼠细胞的蛋白质完全镶嵌。由此实验结

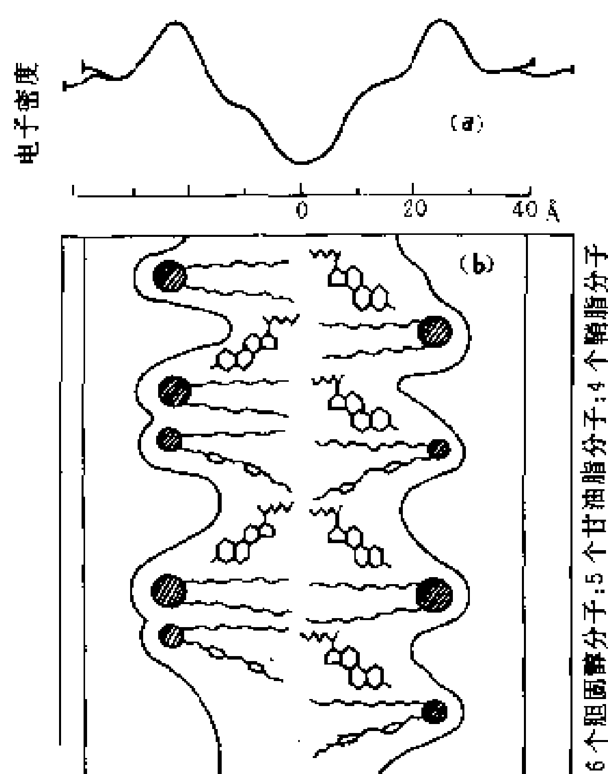


图 5-13

(a)由 X 射线衍射测出兔视神经（稍短的波线）和坐骨神经（稍长的）髓鞘膜相对电子密度与离开中心距离的关系。因其脂质/蛋白质比例高，密度曲线形状主要由脂类决定。

(b)按密度曲线形状（短的内框，长的外框）和已知哺乳动物神经髓鞘膜中各脂类大致比例画出的结构

果也提供了内嵌蛋白侧向扩散的直接证据和脂双层中脂质成分运动的间接证据。但是,可能由于某些内嵌蛋白相互缔合或与细胞质的结构成分相互作用,导致所测得的扩散速度比预期的稍慢些。以其它各种分光技术也获得了脂质分子在膜平面上扩散的证据。

W.Hubbell 和 H.McConnell 运用了能自发透入某些生物膜中的自旋标记 TEMPO〔$O \leftarrow NC(CH_3)_2(CH_2)_3C(CH_3)_2$〕,通过电子自旋共振(ESR)谱测试生物膜成分的流动性,证明了神经细胞膜和肌肉细胞膜的疏水区域具有流体样的低粘度。ESR 技术可以测定自由基中不成对电子(顺磁基团)吸收的能量与外加磁场大小的关系。但是,生物膜在正常情况下不会有这类顺磁性基团,于是必须向所测试系统引进一个含稳定自由基的分子作自旋标记,例如含有氧化氮基团的自旋标记。这种自旋标记必须是疏水的或者是连接至膜内一种正常脂质成分上。由于氮核影响了氧化氮中不成对电子的能量吸收,使 ESR 谱图分裂为 3 个峰(图 5-14)而粘度和周围介质的极性会影响峰的形状和峰的相对位置。他们用提纯后的大豆磷脂小泡做平行实验,也能观察到以同类方式影响 TEMPO 的 ESR 谱图。磷脂的氧化氮衍生物已被当顺磁探针,用于研究典型的生物膜平面上的扩散速度,37℃ 时的扩散速度是每

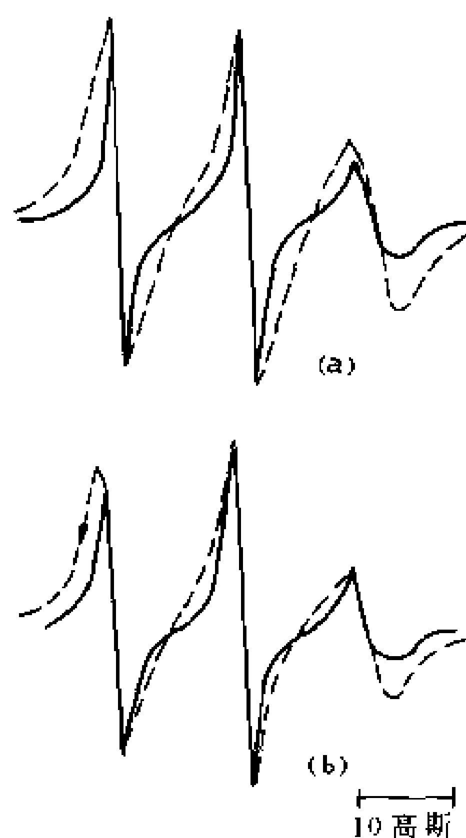


图 5-14　磷脂酰胆碱自旋标记类似物在(a)卵磷脂-胆固醇(4:1)和(b)肌质网膜中的 ESR 谱图
(虚线为 5% 类似物、实线为 0.25% 类似物)1 高斯 = 10^{-4}特斯拉

秒几个微米，说明磷脂分子在几分钟内从动物细胞的一边移动至另一边是可能的，而在典型的细菌中完成相同的扩散过程所需的时间不到1秒钟。上述这些实验为蛋白质和脂质在生物膜中的侧向扩散和建立流动镶嵌模型提供了确凿的证据。

此外，如[^{13}C]核磁共振谱等其它物理测试方法证明了膜脂和膜蛋白能围绕垂直于脂双层平面的轴作自由旋转。但至今物理和化学方法尚未能测出内嵌膜蛋白在生物膜中的跨膜翻转运动。大多数内嵌膜蛋白会暴露出膜的外侧或内侧或两侧的亲水表面区域，从分子间相互作用的观点和能量角度来考虑，需要极性基团脱离亲水表面区域，而与双层中疏水区发生短暂相互作用，以便进行跨膜翻滚，这是非常不利的，所以，脂双层中处于特定方位的内嵌膜蛋白分子在脂双层平面上之跨膜翻滚运动是不会发生的。然而，对磷脂分子的类似测定却发现，当它们获得高活化能时翻转运动是可发生的。不过，在生理温度下，这翻转过程需要的一半时间约长达一天，要比侧向扩散速度慢了许多数量级。

膜脂和膜蛋白的亲水疏水两性性质导致生物膜的不对称拓扑结构，而且生物膜是流动的动态结构，于是呈现出许多生物膜的功能。

5.4.2 膜物理性质及其影响因素

要了解生物膜结构与其功能的关系，务必研究影响和改变以上所述的膜成分动态性质的因素，因为膜成分的动态性质对于膜表面和膜内进行的许多反应过程紧密相关。

脂双层内各成分扩散速度的影响因素有温度和膜成分等，由单一种类磷脂组成的双层，典型地呈现出一些物理性质如能量吸收等在特定又狭窄的温度(相变中点温度 Tm 左右)范围内会发生突变。这是由于在某特定温度范围内温度升高时，随着围绕磷脂中碳氢链上各个碳-碳键的旋转运动增加，脂肪酰侧链的排列从高度有序到较混乱构象的变化导致相变所引起的。通过 X-射线衍射、ESR 谱和差扫描量热法等各种测试技术均可观察到这种物理性质的突变。

热吸收与温度函数关系的实验结果表明，由单一种类纯磷脂组

成的双层才能在相变中点温度Tm左右较狭的温度范围内发生物理性质突变(图5-15),而从细胞分离到的膜双层通常的相变温度(≥10℃)范围宽得多,有的甚至无法分辨出其相变的温度范围。

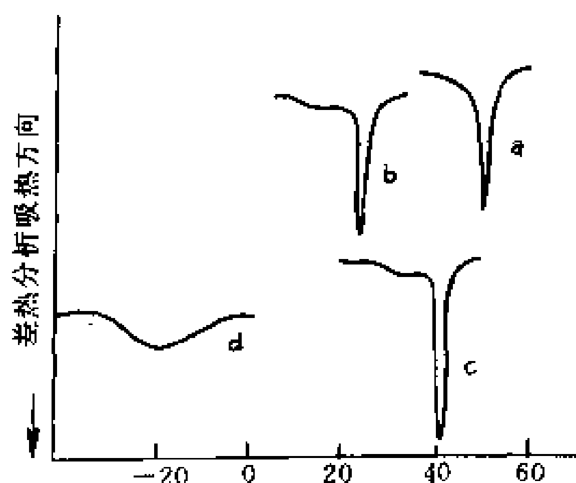


图 5-15 各种磷脂在水中的差热扫描图谱

(a)二软脂酰磷脂酰乙醇胺;(b)二肉豆蔻酰卵磷脂;(c)二软脂酰卵磷脂;(d)卵磷脂(加乙二醇防冻,对突变有影响)

通常,大多数生物膜上的脂都具有不均一性,而内嵌膜蛋白的作用又可降低它们邻近脂质的运动,这就会引起相变温度范围变宽。此外,碳氢链长短与它们在膜双层中的疏水作用力强弱有关,因而长链能使有序状态(凝胶相)较为稳定。所以,对于相变温度而言,具有短脂肪酰链的脂质比含有长饱和脂肪酰链的脂质低。例如,14 烷基无双键磷脂酰胆碱(PC)的 Tm 为 24℃,而 22 烷基无双键 PC 的 Tm 为 75℃。如果脂质的顺式碳氢链中含有不饱和键,就犹似引进了一个"弯曲不协调又僵硬的关节",这也会导致脂双层处于较无序状态,它的相变温度也会移向低温。例如,磷脂酰胆碱(18 烷基无双键 PC)的 Tm 为 58℃,而 18 烷基含双键 PC 的 Tm 只有 −22℃。于是,在一定温度下,脂肪酰链和不饱和脂肪酰链的长度之比例,以及碳氢链中双键的位置都会影响生物膜的粘度和流动性。由于膜双层中不同种类脂质会在不同温度时变成无序状态,因此生物膜的基本特征之一是具有宽的相变温度。

磷脂的极性头部基团的性质也影响着纯磷脂悬液的相变中点温度,磷脂酸(16 烷基无双键 PA)和磷脂酰乙醇胺(16 烷基无双键 PE)的相变中点温度(Tm)分别为 67℃ 和 63℃,磷脂酰胆碱(16 烷基无

双键 PC)和磷脂酰甘油(16 烷基无双键 PG)的 Tm 依次为 43℃和41℃,前二者与后二者相比,Tm 高了约 20℃。14 烷基无双键磷脂酰乙醇胺(PE)的 Tm 为 51℃,而 14 烷基无双键磷脂酰甘油(PG)的 Tm 为 23℃。

Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 等二价阳离子可能会与磷酸头部基团形成离子键,束缚了邻近的磷脂分子,使它们的扩散性质减弱,从而影响了膜的流动性。所以二价阳离子是生物膜良好的稳定剂,若除去了它们,便常引起细胞溶解和外周蛋白解离。

胆固醇能以其极性羟基与膜脂的极性头部基团相互作用,当它插入脂肪酰链间,在磷脂双层中浓度低时所形成的"斑区",其相变温度曲线比磷脂独自时要宽一些;如果膜中含高浓度胆固醇时便会限制磷脂碳氢链的运动自由,从而降低膜成分的流动性,引起了膜"硬化",呈现出抑制了一些依赖于半流动环境的过程。例如,当向纯卵磷脂酰胆碱制成的脂质体掺进多于 20 摩尔% 以上的胆固醇时,脂质体对水和葡萄糖的通透性会减少。与膜上有关的一些过程如某些跨膜传送系统的催化运载反应、内吞作用和胞泌作用等都靠半流动的环境才能进行,生物体的演化达到了较复杂的机制,大多数细胞能保持一定的脂质成分,促使许多膜成分在生长温度下能较迅速地作侧向扩散,以便在各种条件下仍维持这种半流动环境。

上述引人注目的有趣调节作用,其例是各种植物、动物和细菌等细胞能以增加膜不饱和脂肪酸的比例来应付温度的降低,从而确保膜在比较低的温度下仍具备适当的功能。由此可看作至少有两个方面的调节机制:其一是在大肠杆菌和巨大芽孢杆菌等细菌中,参与含不饱和脂肪酸链之磷脂生物合成的这些酶,它们促进合成的活力是受温度的诱导影响;其二是在植物和酵母菌中,生物合成中氧是去饱和酶的底物,在低温下氧的溶解度会增加,则不饱和脂肪酸的生成量提高了。此外,还有光(对于植物)、营养、发育和衰老阶段等其它因素都会影响生物合成不饱和脂肪酸,从而影响膜的流动性。

已观察到许多纯化的内嵌膜蛋白,如自牛心线粒体中分离到的

细胞色素氧化酶，在增溶于水溶液后，仍结合着磷脂分子而自发形成小泡结构。这些结合着的脂质被认为是保持内嵌膜蛋白的结构与功能所必需的。加入硬脂酸的氧化氮衍生物自旋标记，用ESR测试时显示出有两类可动性自旋标记，一类是高度扩散的；另一类运动较慢，可能就是脂质分子围绕酶形成缔合的原因，而与蛋白质结合的脂质分子发生自由交换，造成扩散运动较慢。还有的是胆固醇诱发产生的磷脂-胆固醇区域而形成所谓的“斑”，其中的磷脂分子运动也比膜内的大部分磷脂分子慢。

目前已知，几乎所有的真核细胞在它们细胞质内部都含有由微管和微丝组成的细胞骨架。微管和微丝主要分别由微管蛋白和肌动蛋白组成。微丝在结构上与肌肉细胞的肌动蛋白纤丝相似在细胞的质膜下形成束，它在运动和吞噬作用等过程中起着重要作用，参与细胞表面和质膜内形状的局部或总体变化。微丝与细胞质膜有直接联系。许多动物细胞的一种外周细胞表面糖蛋白称为纤粘连蛋白，它在细胞-细胞和细胞-基质粘附中起作用。以免疫荧光显微镜观察，显示出仓鼠纤粘连蛋白与细胞骨架微丝的跨膜联系，这可能是由于内嵌膜蛋白和其它的外周蛋白之作用，致使纤粘连蛋白的侧向扩散比可以自由扩散的膜脂和膜蛋白要慢5000倍以上。所以，温度、离子环境和组成可影响生物膜的基本物理特征——流动性，而膜成分的局部运动是受蛋白质-蛋白质、脂质-蛋白质以及脂质-脂质的相互作用影响。

5-4.3 生物膜的不对称性和装配

除了上述的化学探针可提供蛋白质在脂双层中单向和不对称的排布信息外，当今已可用冰冻蚀刻电子显微镜技术来直接观察膜成分的排布，此方法是先将整个细胞或膜迅速冰冻，然后用锋利的刀借切片机劈击样品，由于脂双层的两个单层脂肪酰链间只有较弱的疏水相互作用力而成为阻力最小的面，于是在膜脂双层的内外两个单层间是断裂平面。当重金属投影后用电子显微镜观察到两个单层的疏水端内表面。许多生物膜可用冰冻蚀刻技术劈裂成两半，以研究

两个内表面的十分不同之形态，也可从其中发现某些蛋白质是分别处在这两个单层中的某一层内，证实了这些跨脂双层多肽的单向和不对称排布。

从1972年以来，M.S.Bretscher等人发现了人类红血球中绝大部分的磷脂酰乙醇胺和所有磷脂酰丝氨酸，不会被来自细胞外的化学探针实现修饰，但红血球血影细胞的内、外两个单层都暴露而遇化学试剂，于是两个单层的磷酸甘油酯均能被修饰。这些结果表明，生物膜中的脂质存在不对称的排布。后来，采用了降解磷脂的酶（如磷脂酶和鞘磷脂酶）进行实验，测试结果表明，磷脂酰胆碱和鞘磷脂似乎主要存在于红血球细胞膜的外层上，呈现出某些脂质在内、外单层中不等分布的形态。所以，尽管膜磷脂在红血球脂双层内、外两层的数量相等，但每一单层所含的脂质成分似乎可以不同。

一种测定含有伯氨基磷脂（磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸）不对称性排布的理想探针是2，4，6-三硝基苯磺酸〔TNBS，$(O_2N)_3C_6H_2SO_3 + H_2N{\rightarrow}{\approx\approx} \rightarrow (O_2N)_3C_6H_2{-}NH{\rightarrow}{\approx\approx} + SO_3^{2-} + H^+$〕。TNBS具有极性，在低温时不能迅速地穿过大多数生物膜，但它能与完整的细胞（或封闭小泡的含伯氨基磷脂）迅速反应，由此揭示这些含伯氨基磷脂分子是位于脂双层的外单层上。那么，如果能分离和定量由TNBS修饰和未被修饰到的磷脂酰乙醇胺与磷脂酰丝氨酸，便能估计出它们在膜内、外两个单层上分布的相对比例。通过前述的酶学方法或各种物理技术（NMR、ESR波谱和X光衍射等）分析了其它膜质的分布，所得测试结果表明，脂质在脂两层的两个单层中之不对称分布也是生物膜的一个基本特征。

可以认为，某些内嵌膜蛋白与其特定的脂质结合，使脂双层中蛋白质不对称排布能影响它所结合的脂质位置和分布。同时，膜双层中内、外单层接触的溶液是十分不同的（如细胞外环境、细胞质成分和生物膜活性上之差异），它们也有可能引起蛋白质分布的不对称性。总之，根据膜功能的需要，对于各种生物来源的膜而言，脂两层中的蛋白质和脂质成分并不相同，而且又是不对称分布的。

由膜成分的分析结果可知，质膜是最复杂的细胞结构之一。典型的细菌质膜约含100多种不同的蛋白质和多种类型的磷脂，每一种类型磷脂又可按不同的脂肪酸成分分为几类。这些分子以各种不同的形态不对称地排布在膜上，以及特定的定向于细胞膜内侧和外侧。为确保膜成分所需的蛋白质和脂质插入膜中而定位在双层的适当位置上，所谓生源机制的膜生物合成和装配过程，必须按其功能要求有规律又有程序地进行。现在所掌握的这方面信息，大部分是通过对革兰氏阴性细菌质膜和外层膜以及真核细胞内质网（细胞质膜前体）的分析研究，由此膜系统的生源机制推论至其它膜系统生源机制而得出的。

所有生长中的细胞在增长且最终分裂为子细胞的整个过程，需要新的质膜成分的合成、扩展和装配。新合成的膜蛋白和脂质务必在维持膜的通透屏障功能并无破坏双层结构的连续性情况下，有效地插入早已存在的脂双层中。在许多细菌（原核细胞）中几乎所有的膜脂是磷脂，生物合成所需的酶大多数是质膜内嵌膜蛋白，三磷酸甘油的脂肪酸酰化作用以及生物合成、扩展和装配的整个过程均应发生在细胞质膜上。在动物真核细胞中脂类生物合成的酶都是与内质网紧密结合在一起的，细胞质膜应首先通过内质网扩散而形成小泡，再移至质膜上融合而完成的。显然，脂质是被驱动而插进生物膜的。许多亲水的膜脂前体都是在胞浆中合成的，所以，可以视为，在真核和原核系统中膜脂生物合成酶的活性部位均暴露在细胞质一侧。

J.Rothman和E.Kennedy使用膜不通性的探针TNBS，在革兰氏阳性细菌巨大芽孢杆菌中探索了新合成分子是如何被插进膜脂双层的外单层问题。他们采用短脉冲[^{32}P]磷酸标记新合成的磷酸脂酰乙醇胺，然后立即用TNBS处理，他们发现起始在脂双层的外单层上没有同位素标记的磷脂出现，在24℃保温30分钟后，却出现有约1/3的[^{32}P]磷脂酰乙醇胺上有TNBS标记，这与仅用TNBS探针所测得膜中有磷脂酰乙醇胺总量的33%在质膜外单层上，而其余的分布在细胞质一侧的内单层上是一致的。他们从实验事实出发，提

出了有关巨大芽孢杆菌膜脂生物配置的重要结论：新合成的磷脂酰乙醇胺起初只是掺入到内单层中而在外单层出现的速度要比双层模型磷脂翻转扩散速度快约十万倍。然而，脂类的扩展对于在两个单层间造成不对称排布起着重要作用。从内质网的实验也发现，在真核细胞中可获得同样的结论，但以何驱动力和原因促使脂类不进入外单层问题尚未研究清楚。

内嵌膜蛋白的合成装配至少有两条插入途径：有些是在细胞质多核糖体上合成后掺入膜中（所谓翻译后插入）；另一些膜蛋白是由膜结合多核糖体上合成，经一边被翻译，一边随即插入膜中（所谓共翻译插入）。实验发现，膜脂和某些膜蛋白都是在细胞本身的膜上合成，动物细胞膜中的蛋白质成分会随细胞生长阶段和环境因素的改变而变化。在细菌内许多膜蛋白的合成速度会随着细胞生长培养基的变化而改变。从总的来看，内嵌膜蛋白合成和插入膜中装配的速度并不是一定要协调的。实验也发现，膜蛋白的合成和插入装配并无需膜脂的协同合成。当突变体的大肠杆菌细胞甘油饥饿的培养基中继续生长时（约只能一代），由于蛋白质不断地合成，蛋白质与内外层膜脂的比例增加了约 50%。如果外加甘油满足的情况下，使蛋白质合成全部被氯霉素阻断，磷脂也能独立地继续合成和插入膜中装配，并不需要伴随蛋白质的合成和掺入。

然而，可以认为，细胞中膜结构的装配和维持是一个动态过程。膜结合的磷脂生物合成酶活性是由蛋白质-脂质的比例来调节，以使细胞生长期间膜脂和膜蛋白在双层内达到较稳定的比例，首先反映在膜蛋白和膜脂合成的差比速度上的调节。如果在大肠杆菌磷脂生物合成突变体的培养基中不加甘油，饥饿一个时期后再添加甘油，能使含有丰富蛋白质的不正常细胞膜显示出比不饥饿细胞快得多的磷脂合成速度。又因为膜成分在合成后装配到正在生长的膜上之同时，它们在新陈代谢中也以较慢速度不断地被降解。尽管此周转过程是随着分子类型不同而异的，但是膜磷脂比膜蛋白具有更短的半衰期（较高的周转率）。这种连续周转的动态过程，还能使细胞为适

应环境(如温度、营养等)的变化而迅速地调整其膜成分,则导致它们的“使用寿命”变化极大。

5.5 生源机制的信号学说和其它机制

通常,磷脂是相对分子质量小于1000的分子,当它们被膜结合酶催化合成后,由于它们本身是易形成胶束的表面活性剂和混合自由能为负值而可自发地掺入脂双层中。不过,大多数内嵌膜蛋白的相对分子质量在$10^4 \sim 10^5$,并含有一定比例的高度亲水氨基酸,而且当它们从细胞内合成的场所部分或全部穿过膜双层的疏水区域而插入膜后要在双单层中形成不对称和单向定位的排列,说明膜蛋白装配的生源机制比膜脂要复杂得多。

5.5.1 膜蛋白和分泌蛋白生源机制的信号假说模型

实验发现,细菌肽聚糖外壳似乎是由C_{55}类异戊二烯脂载体,即细菌萜醇参与携带肽-二糖“结构单元”穿越细胞质膜而插入到正在生长的细胞壁。革兰氏阴性细菌外层膜的脂多糖末端的O抗原碳水化合物部分,也是附在细菌萜醇上后才插入细胞质膜外表面的膜糖蛋白上。在真核细胞有相似萜醇的长萜醇参与碳水化合物残基向膜糖蛋白转移。

C. Milstein和G. Brownles等在研究可大量合成和分泌特殊免疫球蛋白轻链的小鼠骨髓瘤细胞时,发现此类分泌蛋白是在粗糙内质网(ER)膜上布满的核糖体处发生的。这些蛋白质穿过膜进入腔内结合糖残基,并被载体小泡有序地转运到高尔基体加工(增接糖残基),再由高尔基体形成的小泡与细胞质膜融合,然后将分泌蛋白释放至细胞外。对于动物细胞的质膜蛋白合成与装配也有相似的历程,不过最后导致内嵌糖蛋白插入质膜中。从这些骨髓瘤细胞上取出的多糖体也能指导合成轻链多肽,但以此合成的蛋白质相对分子质量比完整的粗糙内质网上合成的要大约1500。这多出的片段位于蛋白质的氨基端,通过研究,认为这片段可能是一“指导信号”,指

令正在延伸的肽链插入粗糙内质网膜中，当在穿越内质网膜而不需要“信号”时，可被一个或许与膜结合的蛋白酶(加工)切除掉。

1975 年 G.Blobel 和 B.Dobberstein 经进一步研究，提出了蛋白质穿越粗糙内质网的信号假说。他们认为：

(1)mRNA 的翻译是由非膜结合的“游离”核糖体启动后，首先合成一条对应于信号密码子的氨基酸信号顺序。

(2)mRNA 为那些将被输出内质网膜的蛋白质编码时，在“信号密码子”的起始密码后面紧接一特定密码子的顺序。这条信号顺序在核糖体上出现后，便吸附到膜上，使信号顺序附近形成一个穿膜小孔。

(3)当继续翻译时，新合成的多肽链被挤过孔，部分进入腔中，在多肽链完全合成之前，信号顺序被切除。

(4)翻译的终止作用使蛋白质完全进入粗糙内质网腔中，核糖体亚基由 mRNA 上解离，便从膜上脱附，于是小孔消失。

(5)输出的蛋白质含有信号顺序，由于此信号顺序发出信号，方使新合成的肽链和核糖体附于膜上。

内嵌膜蛋白的插入也可用信号学说解释。例如，在水泡性口膜炎病毒(VSV)感染的动物细胞膜中，存在着大量由病毒基因组指导合成的外突 G 蛋白，它是一种跨膜的糖蛋白，在被 VSV 感染的细胞粗糙内质网上合成的，又于翻译完成之前，在粗糙内质网腔内将碳水化合物残基结合到蛋白质上。研究结果表明，G 蛋白先被合成为具有一条信号顺序的前体，该蛋白质插入膜中与信号顺序的切除是同时进行的，随后，VSV 的 G 蛋白自粗糙内质网转移经高尔基体，以小泡与质膜融合而插入细胞质膜上。最后 G 蛋白定位于细胞质膜上，碳水化合物残基处于膜外侧。大概其它真核细胞的膜糖蛋白也有如此相似的历程。

Geoffrey Zubay 在生物化学一书中作了总结认为，对真核生物和原核生物的研究，结果表明，信号学说的某些要点得到了支持。某些线粒体和叶绿体的膜蛋白以及大肠杆菌的外层蛋白都是先合成前

体，而在翻译期间或翻译后被切成"完整"蛋白，大肠杆菌的几种需穿越内膜而分泌的外周蛋白也是连同信号顺序一起被膜结合的核糖体翻译的，这些顺序中含有较多的疏水氨基酸，估计能使合成的多肽和核糖体一起转移到膜上。这得到用膜不通透性的标记实验证明，大肠杆菌输出蛋白的新合成多肽都暴露在细胞外侧，它们又与细胞内侧的核糖体相连接。于是，可以认为在这个系统中，蛋白质的翻译和穿过膜是共同进行的，在完全合成之前，伸展的多肽链已横跨膜内了。

J.Beckwith 和 T.Silhavy 等也对大肠杆菌细胞的遗传学前沿课题进行了研究，证明信号顺序在膜蛋白的插入装配和输出某些蛋白过程中的重要作用。在实验中，对麦芽糖（双糖）专一传送的有关蛋白基因的各自部分（malF、malE 和 malB）能融合可溶性酶 β-半乳糖苷酶的大部分基因（lac Z），其产物一般分别位于内膜、周质间隙和外膜上。载有这些杂种基因细胞所合成的杂种蛋白的氨基端，含有嵌膜蛋白或输出蛋白，并共价连接一个易用分光光度计法测定的 β-半乳糖苷酶分子。上述三种杂种蛋白的位置很易经细胞分级和 β-半乳糖苷酶活性的测定来确定，对于前两种融合基因的产物，β-半乳糖苷酶的活性在内膜上呈现，对于后一种融合基因的产物，β-半乳糖苷酶的活性是在外层膜上显现，这一结果与信号学说一致。

5.5.2 其它生源机制

某些线粒体和叶绿体的膜蛋白、内质网膜的细胞色素 b_5 和 NADH：细胞色素 b_5 还原酶、以及大肠杆菌与其它细菌的几种质膜蛋白等内嵌膜蛋白质的合成和插入历程用信号学说还不能充分解释。因为它们是在非膜结合的可溶性核糖体上合成的，并在转译后装配入膜的。不少的此类内嵌膜蛋白在合成时并无信号顺序，有的虽然需要信号顺序，但不能完全保证蛋白质正确地装配和分泌。膜上有些蛋白质拓扑构型的构象变化，难于用信号学说中的载体"穿透小孔"机制来解释。

例如，大肠杆菌的乳糖传送蛋白（称乳糖透性酶）不是以前体形

式合成的一种细胞质膜内嵌蛋白，它缺少了前导的信号顺序。还有其它几种细菌膜蛋白、线粒体、叶绿体和内质网膜上的有些蛋白质也有相似现象，说明有些膜蛋白插入膜过程既不需要信号顺序，也不需作前体加工，仍然可插入膜的正确位置。尚有不少内嵌膜蛋白如红血球阴离子传送蛋白，它的羧基端氨基酸残基位于细胞外侧，而氨基端暴露在细胞质一侧，即以信号学说所预期的相反方式作跨膜拓扑学定位；又如细菌视紫红质，多肽链跨膜 7 次，也难于用信号学说中的信号顺序-微孔机制来解释，于是有的学者提出了修正的机制。

W. Wickner 提出了有关膜蛋白装配机制的膜触发假说，认为某些膜蛋白的合成无需非在膜结合的核糖体上进行不可，这些膜蛋白在可溶性多核糖体上合成后，具有一种在水溶液中比较稳定的构象。可溶性前体扩散到膜上因其与膜的疏水环境接触时能诱导(触发)形成另一种构象，于是这些蛋白质分子在插入双层过程中经历了构象上的变化。(作者也发现聚乙烯醇在不同溶液环境中可以发生构象变化，或形成包合物，或形成配位聚合物，则认为某些蛋白质在水中或者疏水环境中发生构象变化的假说是可以成立的。)当蛋白质切除了氨基端延伸段的氨基酸后，此种诱导所形成的构象于蛋白质装配至膜的适当位置后便稳定了。因此，这类膜蛋白的插入是诱导变构装配过程，并非是由膜结合的转译机构导致跨膜微孔的催化过程。

由上可知，膜触发学说能较好地解释某些蛋白质在膜中的配置情况，但也应该认识到生物细胞中膜蛋白装配和胞外多肽的分泌是个复杂问题，细胞并非只有一种途径可予以实现。对此领域的进一步研究，对于理解生物膜的结构和功能将会有极大的帮助。

5.6 跨膜传送

膜的动态结构和不对称配置促使营养物质和无机电解质穿透膜而进入细胞内，并使有害物质和废料排出细胞外等跨膜传送过程，往往成为单向性的。现已知一些专一性地携带特定分子(或亲水性代

谢物)的内嵌膜蛋白，能以满足细胞生存与生长的速度穿过通常呈不透性的脂双层(或疏水区)而作跨膜传送运动。对于传送蛋白(透性酶)分子的物理化学性质和机制的研究，必须依靠分离和提纯的精巧技术，以得到足够纯度的内嵌膜蛋白，以及表面活性剂的应用，才使我们有可能对内嵌膜蛋白在增溶状态下进行分离和研究。原核和真核细胞的跨膜传送及其相关功能的基本原理，很有可能适用于整个生物界。所以，研究和讨论这些细胞的跨膜传送过程的基本原理和传送的具体方式很有必要，它使我们有可能去设想和总结各种传送机制的特征，并据此设计实验以获得跨膜传送的有用信息。

5.6.1 简单扩散和载带传送

被动的简单扩散和载带传送是某些物质跨越膜屏障的两种根本不同的机制，简单扩散的有关分子必须能溶解于膜脂双层的疏水相，借以跨越过膜，这仅是生物输送体系中高疏水分子的输送过膜的必要条件。但水分子例外，它能以简单扩散形式穿透许多生物膜。简单扩散也是一些具有非特异性流通的膜体系输送物质的机制。传送则需要另一种分子(通常是膜内嵌蛋白质分子)作为载体媒介，由它载带以促进某些物质跨越过膜。

(一)简单扩散的特点

设想两种不同浓度(C_0 和 C_0')溶质的溶液被只能让该溶质通透的隔膜分开，原始时 C_0 是 C_0' 的两倍，溶质的不规则热运动，在特定时间 t 内膜两侧的该溶质分子都会向另一侧对流，这种双向流动使隔膜左边的浓度同在右边浓度的比值减少(图 5-16)，随着时间的推移，该比值会越来越趋近 1:1 以至达到平衡，该溶质 C_0 从左侧扩散到右侧的分子数(即输送速度)是与左侧该溶质的起始浓度成正比，即

$$v' \propto [C_0] \tag{5.6-1}$$

同时，在相反方向上运动的分子也有相同的关系，即

$$v' \propto [C_0'] \tag{5.6-2}$$

式中 v、v′ ——分别表示左

向右和右向左的输送速度；

C_o、C_o'——依次表示膜左侧和右侧溶液中特定穿透性溶质的起始浓度。

于是该溶质从高浓度向低浓度输送的净速度为正、反两速度之差，也就是

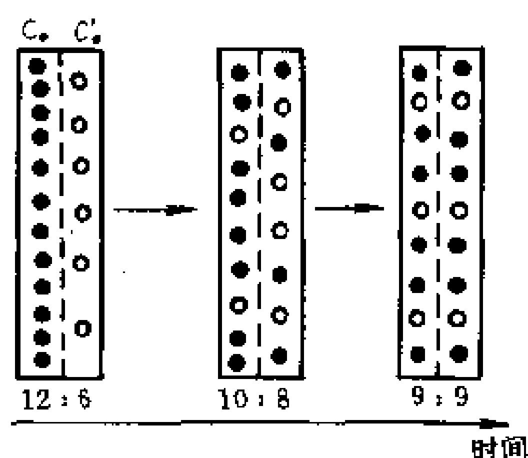


图 5-16　半透膜隔开的两部分容器中简单扩散示意图
所示分子是相同的，黑点和空圈只是为了区分左右两侧容器中分子所作的标记

$$V = v - v' \propto [C_o] - [C_o'] \qquad (5.6\text{-}3)$$

平衡时，$V = 0$

生物膜具有一定厚度 L，输送速度必正比于浓度梯度，即

$$V \propto \frac{[C_o] - [C_o']}{L} \qquad (5.6\text{-}4)$$

溶质的输送速度还与温度、溶剂粘度、溶质与溶剂及膜中成分相互作用等因素有关。在给定的系统中，这些因素通常可控制不变，于是可用比例常数 D 概括。

$$V = \frac{D[C_o] - [C_o']}{L} \qquad (5.6\text{-}5)$$

式中　D——代表扩散系数。

D 是单位时间内的面积量纲 (cm^2/s)，公式表示扩散的净速度与通透膜的溶质浓度梯度成正比，亦就是 Fick 定律表达式。

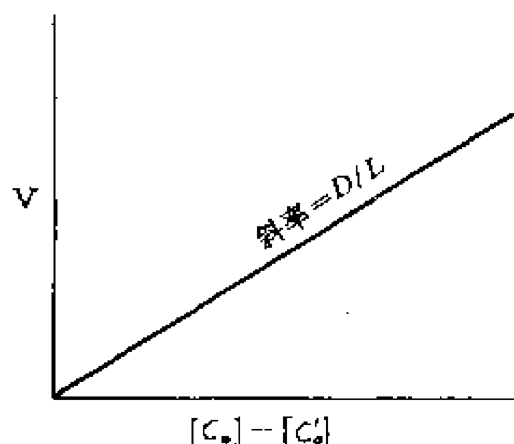


图 5-17　简单扩散的初速度动力学

一个借简单扩散通透膜的

系统内，以 V 对$[C_o]-[C_o']$作图，可得斜率为 D/L 的过原点直线（图 5-17）如果对某溶质的浓度梯度与跨越细胞质膜的速度，在一定的影响因素条件下，进行大量研究和测定，若得到的 V 对$[C_o]-[C_o']$是一直线，便可证明该溶质的输送是简单扩散。简单扩散输送动力学只反映通透膜细胞质膜的扩散分子少数情况。

（二）蛋白质媒介的载带传送

载体媒介的传送是细胞质膜通透分子更常见的情况。它的传送动力学 V 对$[C_o]-[C_o']$作图所示曲线相似于图 3.3，接近于直角双曲线（参见图 5-18）。载体媒介传送的速度方程与第三章稳定状态酶动力学导出的方程相似，实际上亦就是类同于（3.2－8a）的 Michaelis-Menten 方程。

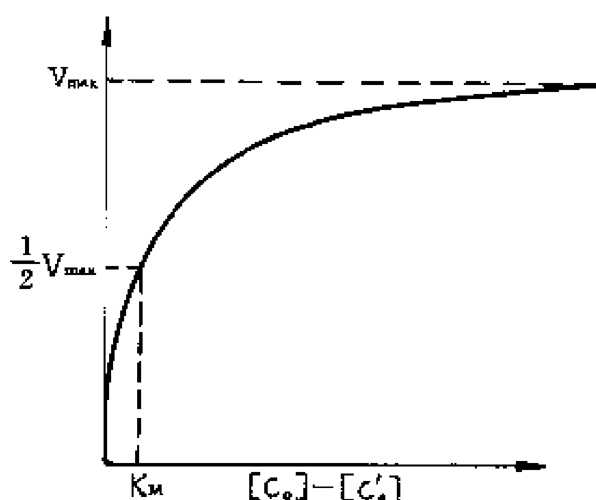


图 5-18　载体媒介传送的起始速度动力学双曲线

$$V=\frac{V_{max}[C_o]}{K_M+[C_o]} \tag{5.6-6}$$

在（5.6-6）式中，忽略了$[C_o']$，则$[C_o]$为正被研究的细胞（或囊泡）所处溶液中某传送溶质的起始浓度，即当$[C_o']=0$时，$[C_o]$等于膜外的起始浓度，V 是溶质进入细胞膜系统的起始传送速度。

传送速度在溶质浓度趋近“饱和”$[C_o]-[C_o']$量时的极限值V_{max}，暗示溶质的传送依赖于膜上含一定量的载带体，这些载体在溶质饱和的高浓度梯度情况下类似于酶被底物饱和的情况。K_M 是溶质在 $V=\frac{1}{2}V_{max}$时的浓度，是由传送过程中各步骤速度常数组合而

得之值，常被用于衡量对底物的亲和力。

对作为底物浓度$[C_o]$函数之传送速度的研究，发现以双倒数（$1/V$对$1/[C_o]$）作图，简单扩散和载体媒介传送的图解都是一条直线。不过，简单扩散的直线通过原点，而载体媒介传送的直线与纵轴交于$1/V_{max}$，又与横轴交于$-\frac{1}{K_M}$处（图5-19）。根据此特征，可以分辨溶质的输送机制。

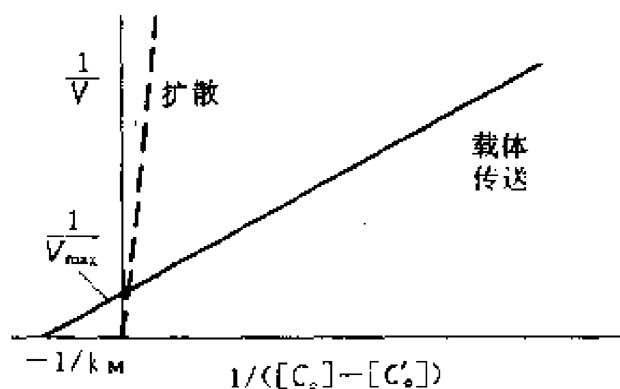


图5-19　简单扩散与载体传送的双倒数作图

载体媒介传送系统的V_{max}为定值，这表明载体系统是可饱和的，而简单扩散的V_{max}是非定值，当$V_{max}\to\infty$时，$1/V_{max}$趋近于零，扩散不存在饱和现象。

事实上，某些特定溶质向细胞内或某小泡内的输送历程是复杂的，有时发现双倒数曲线是非线性的（图5-20），通常它表明不止一种过程参与物质向膜内传送，可能有扩散也有载体媒介传送，或者也有都是载体媒介传送的可能。

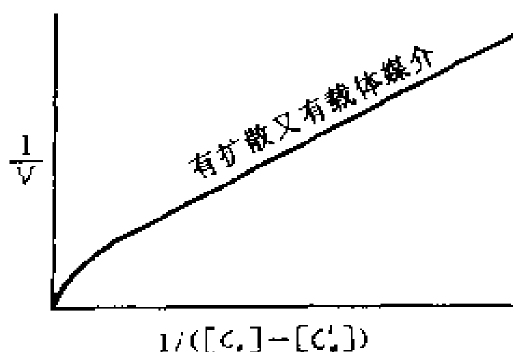


图5-20　给定溶质有简单扩散又有载体媒介系统共同参与的传送动力学

在多数情况下，载体媒介传送具有立体结构特异性，这是传送蛋白的"活性部位"对于其"底物"的构型具有高度选择的结果。通过仅简单扩散输送葡萄糖的膜系统条件下实验，可以发现，D-葡萄糖和L-葡萄糖都以同一扩散速度透过膜。对于含有葡萄糖

特异性载体的生物膜而言，该载体媒介传送只识别D型立体异构体，于是这些细胞膜对D-葡萄糖的起始传送速度远大于L-葡萄糖的起始输送速度，且具有最大定值的“饱和”特点。如用L-葡萄糖载体媒介传送的真实速度修正，便可求得D-葡萄糖载体媒介传送真实速度。

5.6.2 跨膜传送的自由能解析

溶质倾向于自发地从高浓度区到低浓度区沿着浓度梯度减少的方向扩散，直到平衡。自起始状态$[C_o]>[C_o']$到达平衡状态$[C_o]=[C_o']$，使该溶液的分布从较浓集到均一，即从较有序到混乱，其熵值S是相对增大，按$\Delta G=\Delta H-T\Delta S$公式，熵值的增大会引起自由能负的变化，自发扩散过程不需外界供能，所以自由能ΔG为负值。图5-16所示的情况下，ΔG的计算式为

$$\Delta G=RT\ln\frac{[C_o']}{[C_o]}=2.3RT\log\frac{[C_o']}{[C_o]} \qquad (5.6\text{-}7)$$

由此可知，自左到右自发传送的条件是$[C_o']/[C_o]<1$在平衡状态时$[C_o']/[C_o]=1$，$\Delta G=0$。在生物体系中，简单扩散和载体媒介传送的扩散(或称促进扩散)所导致某一溶质的传送，只能在ΔG为负值的方向上自发进行。一般的载体媒介传送扩散和简单扩散均可使膜两侧的某一溶质达到平衡，两侧的$[C_o]=[C_o']$。如果溶质在膜两侧的溶解特性截然不同或带有净电荷，例如某溶质带有电荷，膜上又存在独立维持的跨膜电势$\Delta\psi$，上述两种扩散都只能达到一$[C_o]\neq[C_o']$的平衡状态，根据前述的(2.2-13)公式则可写成

$$\Delta G=2.3RT\log\frac{[C_o']}{[C_o]}+ZF\Delta\psi \qquad (5.6\text{-}8)$$

式中 Z——代表溶质的净电荷；

F——代表法拉第常数。

平衡时$\Delta G=0$，则

$$-2.3RT\log\frac{[C_o']}{[C_o]}=ZF\Delta\psi \qquad (5.6\text{-}9)$$

只要 $ZF\Delta\psi \neq 0$,膜两侧的溶质浓度就不会相等,这时溶质在膜两侧的浓度差与跨膜电势之间形成化学势的平衡。

若溶质不带电荷且不存在跨膜电势,虽然均不需能量供给的简单扩散和载体媒介传送的扩散与生物输送机制不同,但两者也都不能导致溶质的浓度在膜一侧高于另一侧。然而人们发现多数细胞均能维持细胞内某一特定代谢物或离子的浓度高于胞外。例如许多细胞的胞内 K^+ 浓度至少是周围介质中 K^+ 浓度的 30 倍。根据热力学分析,若细胞膜上存在着聚集某一溶质的载体(如 K^+ 的载体媒介传送),它要朝着 ΔG 为正值的方向(即朝溶质浓度梯度增大的方向)传送该溶质时,必须同 ΔG 更为负值的过程偶联,从中吸取能量作功,以推动溶质浓集过程越过势垒。这种需要消耗代谢能量使溶质在细胞内、细胞器内及小泡内浓集的过程称主动传送。

5.6.3 主动传送和基团转移(或称基团移位)机制

关于主动传送有以下两种基本类型:

(1)初级主动传送

此类传送是直接由 ATP 水解、电子沿电子传递链流动或光提供能量作功。这类主动传送酶之例有动物细胞中消耗 ATP 提供自由能,使 K^+ 泵入细胞内,又将 Na^+ 泵出细胞外的 Na^+—K^+ ATP 酶;促使 H^+ 排出线粒体的呼吸电子传送链(第四章)以及嗜盐细菌中细菌视紫红质的光驱动 H^+ 泵。

(2)次级主动传送

次级传送是由主动传送系统产生的跨膜离子浓度梯度所形成的势能,它随着浓度梯度消失过程而释放能量作功,可用于驱动其它离子或代谢物在膜一侧的浓集。在呼吸代谢过程,线粒体和细菌以 H^+ 浓度梯度形式贮存的势能被用于合成 ATP。原核生物和真核生物的细胞中 H^+ 浓度梯度或其它离子浓度梯度也会是主动传送的重要能量源。

一种与初级主动传送相关联的基团转移(移位)过程是 P.Mitchell 在三十多年前提出的。它是由主动传送系统将传送分子

作跨膜穿透时，被某基团转移过程进行了化学修饰。例如，存在于许多细菌中的糖透性酶，在载带糖底物传送的同时催化糖的磷酸化。磷酸的供体是高能磷酸糖酵解中间产物磷酸烯醇式丙酮酸。这种基团移位是细胞在底物分子传送过程中将从培养基中吸收到的糖，因磷酸基团转移而转变成糖单磷酸。图 5-21 示意初级、次级主动传送及基团转移间的区别，表 5-5 概括了一些动物和细菌的细胞中传送系统在能量形式上的偶联。

表 5-5　已明确的传送系统的能量偶联模型

底物溶质	泵方向	能量偶联	生物体(组织)
Na^+—K^+	出—入	初级主动(ATP)(Na^+—K^+ ATP 酶)	动物细胞
Ca^{2+}	出	初级主动(ATP)(Ca^{2+} ATP 酶)	肌质网
H^+	出	初级主动(ATP)(H^+ ATP 酶)	胃表皮细胞质膜
H^+	出	初级主动(光)(细菌视紫红质)	嗜盐细菌
H^+	出	初级主动(电子传递链)	线粒体，细菌
H^+	出	初级主动(ATP)(F_1/F_oATP 酶)	厌氧细菌
各种糖和氨基酸	入	初级主动(化学能)(结合蛋白系统)	革兰氏阴性细菌
乳糖	入	次级主动(H^+ 共同传送)	大肠杆菌和某些其它细菌
葡萄糖	无	载体媒介(促进)扩散	大多数动物细胞
葡萄糖	入	次级主动(Na^+ 共同传送)	某些动物细胞
葡萄糖	入	基团转移(磷酸转移酶系统)	大肠杆菌和某些其它细菌
HCO_3^-—Cl^-	无	载体媒介(促进)扩散(离子通道)	红血球
ATP－ADP	出—入	促进扩散对膜电位敏感(ATP/ADP 交换蛋白)	线粒体

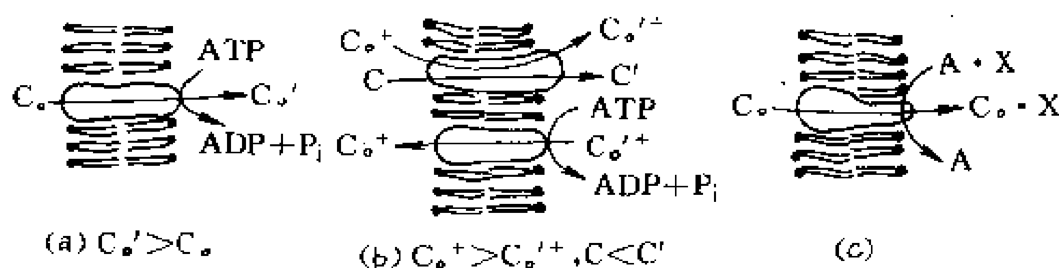


图 5-21

(a)初级主动传送示意，能量来自 ATP；(b)次级主动传送示意 C 的传送聚集是由 C_o^+ 主动传送造成浓度梯度而导致沿其传送方向的 C_o^+ 离子协同传送提供能量；(c)基团转移示意，C_o 跨膜传送过程中由载体催化化学修饰成 C_o·X 衍生物而集积

5.6.4 研究膜传送的实验方法

研究分子跨膜传送机制，在分子水平上弄清传送蛋白行使其功能的物理化学性质，通常是采用放射性标记的某一特定溶质分子，测定该放射性溶质进入细胞与时间有关的传送速度，就能得到该溶质正被传送越过细胞膜的信息。对生长在培养基中的许多动物细胞，每隔一定时间取一盘试样，用不含待测溶质的缓冲液(或培养液)迅速冲洗这些粘附在器皿壁上的细胞，促使细胞内与细胞外的带标记分子分开，便可测定放射性溶质摄入细胞内数量与时间关系。对细菌和某些小真核生物(如酵母菌、原生动物)可通过离心或过滤使细胞与介质迅速分离，然后进行测定。

对于具有特定光波吸收峰物质的少数特殊情况下，可用快速简易的分光光度分析法来测定该物质进入细胞的传送速度。例如采用邻硝基苯-β-半乳糖苷(ONPG)来研究大肠杆菌中的乳糖传送。ONPG 是通过乳糖透性酶(基因 LacY 的产物)载运入细胞，在细胞内被 β-半乳糖苷酶水解生成半乳糖和邻硝基酚(图 5-22)，邻硝基酚为黄色，能用分光光度计来定量测定。此过程中的传送是限速步骤，所以细胞悬浮液中的水解生成物邻硝基酚可用于测定乳糖载体传送 ONPG 的速度，这有助于对大肠杆菌传送乳糖机制的研究。

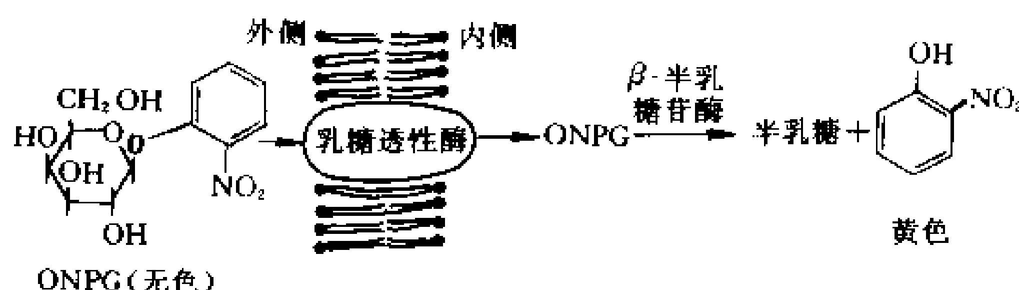


图 5-22　利用邻硝基苯-β-半乳糖苷(ONPG)为传送底物的分光光度法测试原理

研究许多细胞常作为碳源和能源的葡萄糖传送速度，需要用某些不会在细胞内被代谢的底物类似物，倘若被传送的底物在细胞内会进一步代谢，就会影响传送速度的测定。这些葡萄糖底物类似物有α-甲基葡萄糖苷 $HOH_2C\underline{CHCH(OH)CH(OH)CH(OH)CH}OCH_3$（环内 O 连接）和 2-脱氧葡萄糖 $HOH_2C\underline{CHCH(OH)CH(OH)CH_2CH}(OH)$（环内 O 连接）。它们在细胞内只能进行己糖磷酸化过程而不会被代谢掉。在对细菌的研究中还用过分离突变体技术，让这种突变体能传送某种溶质，但由于缺乏促使该溶质化合物进入细胞后进一步发生其它反应的酶，这样便可测定传送体系的许多物理化学特性，不致于受随后反应的影响而造成复杂的后果。

制取细胞膜的质膜小泡结构已成为研究膜传送现象的理想技术，一般常用温和匀浆法或氮"爆"法从真核细胞中分离出来而不会破坏细胞壁的完整性。H.R.Kaback 自大肠杆菌中制取膜小泡，发现绝大多数膜小泡中内嵌膜蛋白的排布方向与完整细胞膜中的相同，只要提供足够的能量来源，膜小泡便能透入很多大肠杆菌所要传送的物质。这些膜小泡缺少能催化代谢底物的大多数细胞质酶，此特点有利于限制被传送底物的代谢。此类膜小泡也特别适用于研究主动传送的偶联机制。研究人员可将不同的能源一个个分别地注入

到所制备的膜小泡中，以观察它们对所研究传送系统的作用。在完整细胞内有时由于细胞质中会发生多种代谢的干扰，使实验很难获得满意的结果。

5.7 几例酶媒介传送系统简介

5.7.1 酶媒介(促进)扩散系统

在细菌和动物细胞中已证实存在有靠酶媒介的促进扩散系统。E.Lin 等对大肠杆菌的研究中发现了促进扩散的蛋白，这种蛋白允许成为许多细菌唯一能源和碳源的甘油穿透细胞。促进扩散的蛋白增加甘油通过磷脂双层的速度，但不能使之在细胞内累积。

对甘油促进扩散蛋白的进一步研究，认为此透性酶具有非特异性小孔的特性。该传送系统可让很多种直链多元醇(如甘油、丁糖醇、戊糖醇和己糖醇等)通过细菌的细胞膜。不过可能因空间位阻，环状的糖类似物不能被传送，而尿素、甘氨酸、D-甘油醛和 L-甘油醛等中性小分子或带正、负电荷相当的两性离子却能被此系统传送。另外又发现甘油和木酮糖在传送过程中并不发生竞争，在生理浓度下也不呈现饱和动力学特性，且热对传送非敏感性。这些信息都显示它虽需要载体蛋白传送，但还是属于扩散过程。根据观察，甘油促进扩散蛋白是具有内径为 0.4nm 的非特异性水状通道，但尚未发现大肠杆菌质膜内有其它非特异性微孔。

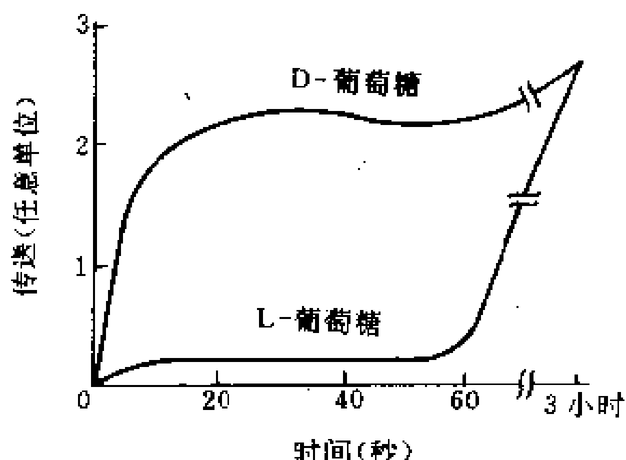


图 5-23 人类红细胞葡萄糖载体参与的促进扩散

(显示出葡萄糖载体对 D-葡萄糖有传送的特异性)

对于动物细胞的类别不同，能源葡萄糖的传送机制可有差异，有时在同一类细胞中可同时存在葡萄糖的主动传送系统和被动传送(即促进扩散)系统。P.Hinkle 等用 TritonX-100 分离人类红细胞的葡萄糖运载蛋白，将此载体蛋白增溶后，导入磷脂双层膜小泡中，实验显示此重新组装的载体蛋白很快地使底物 D-葡萄糖比 L-葡萄糖以大得多的初速度传送穿越磷脂双层(参见图 5-23)，而 L-葡萄糖通过自由扩散进入膜小泡，并和 D-葡萄糖在膜小泡内外达到平衡浓度。显然，在人类红细胞中 D-葡萄糖仅以促进扩散方式传送，尚无迹象表明，该载体蛋白具有主动传送的能力。

前述红细胞的阴离子传送蛋白(第三条色层分离带)能将呼吸组织红细胞中积累的 CO_2，以 HCO_3^- 的形式从肺毛细管迅速扩散出去，伴随着这个过程的进行，Cl^- 进入了红细胞，并与阴离子传送蛋白载运的 HCO_3^- 以 1:1 之比进行交换。HCO_3^- 排出细胞与一价阴离子(如 Cl^-)进入细胞是专一性偶联(见图 5-24)的，整个过程称交换扩散。由于两种离子在膜两侧以相反方向偶联传送，两者的浓度梯度之和决定这两种阴离子交换扩散形式，所以也称作反向传送过程。

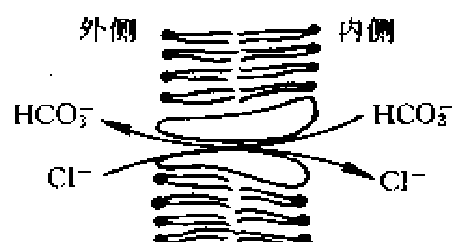


图 5-24 人类红细胞阴离子通道蛋白促进阴离子交换扩散
(对除去细胞代谢产物 CO_2 有重要意义)

5.7.2 $Na^+—K^+$ ATP 酶的初级主动传送系统

J.C.Skou 首先从蟹神经系统中发现一种仅在 Na^+ 和 K^+ 存在时才能促使 ATP 水解成 ADP 的酶。随后的研究认为，此 $Na^+—K^+$ATP 酶是一种跨膜蛋白，它在催化水解 ATP 时消耗了其中 β、γ-磷酸酐键的能量来作功，将 Na^+ 泵出细胞，把 K^+ 泵入细胞，使这两种阳离子都逆各自的浓度梯度而作单向传送，以维持动物细胞内正常的高 K^+ 浓度和低 Na^+ 浓度状态。这已是研究得较详细的生物初级主动传送系统，也是化学能和浓集传

送过程偶联的初级主动传送和主动反向传送系统之例。图 5-25 所示，Na^+—K^+ ATP 酶经一次循环的作用，将 3 个 Na^+ 泵出细胞，2 个 K^+ 传入细胞，同时水解 1 分子 ATP。同一种酶催化两种离子反向传递和水解 ATP，ATP 水解释放的能量由 Na^+—K^+ ATP 酶转化为跨膜 Na^+、K^+ 浓度梯度形式储存的化学势能。现大致上已知该跨膜酶含有大的催化亚基（相对分子质量 95000）和较小的糖蛋白（相对分子质量 50000）。K^+ 对该酶的外侧表面有较高亲和力，Na^+ 与酶在胞质一侧结合得较紧，ATP 的水解催化部位是位于细胞质膜内侧处酶的内表面，表明 Na^+—K^+ ATP 酶在质膜上是不对称配置。

为了证明 Na^+—K^+ ATP 酶同时催化 Na^+、K^+ 主动反向传送和 ATP 水解的三个过程是紧密地偶联着，人们采用了从某植物中分离得到的一种叫乌苯苷化合物作专一性抑制剂，它能专一性地结合在跨膜配置的 Na^+—K^+ ATP 酶外侧表面，却能阻止上述三个过程进行。这启迪了研究者，他们认为乌苯苷在该酶外表面结合而阻止 K^+ 的泵入，又将信息传递过膜，进而抑制在胞质表面该酶对 ATP 水解的催化活性，只有通过酶的构象变化方能实现。

对纯化的 Na^+—K^+ ATP 酶的研究发现，在该酶催化循环中，此酶蛋白分子的门冬氨酸残基上发生了共价磷酸化和去磷酸化的循环变化。在 Na^+ 和 ATP 及 Mg^{2+} 存在时，形成了磷酸化的 Na^+—K^+ ATP 酶，而去磷酸化过程需要 K^+ 的存在。在有 K^+ 的情况下，乌苯苷的加入能与酶-磷酸中间物结合得非常紧密，从而阻止了去磷酸化。根据一系列的研究，设计了有关 Na^+—K^+ ATP 酶的作用模式，如图 5-26 所描绘的那样，膜两侧该酶跨膜暴露部位的磷酸化、去磷酸化以及配基的结合，引起了该酶的构象变化，导致 ATP 水解和 Na^+、K^+ 各自跨膜移位。但

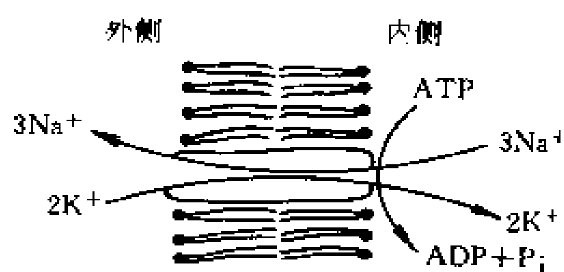


图 5-25 动物细胞中发现的 Na^+—K^+ ATP 酶对 Na^+ 和 K^+ 的初级主动传送

对酶蛋白的构象变化而如何引起离子的单向跨膜传送尚无满意的解释。

根据 Na^+—K^+ ATP 酶的功能假设机制，假设至少存在了两种构象 E_1 和 E_2，且均可磷酸化。E_1 仅与 Na^+ 有高度亲和性，它的磷酸化启动 E_1 与 E_2 构象变化循环过程开始单向进行，致使 Na^+ 从膜内表面转移至外表面。伴随 ATP 分解作功促使 E_1 磷酸化，酶构象从 $E_1 \sim P$ 到 $E_2 \sim P$ 的转变，这会降低该酶和 Na^+ 的亲和性而脱去 Na^+ 离子，同时提高了它与 K^+ 的亲和性而俘得 K^+。E_2 仅与 K^+ 有高度的亲和性，$E_2 \sim P$ 去磷酸会驱使 K^+ 自外表面传送到内表面。在 E_2 构象转变成 E_1 构象的过程中减少了酶与 K^+ 的亲和性而脱出 K^+，同时加强了与 Na^+ 的亲和性而捕获 Na^+。在 Na^+—K^+ ATP 酶的一系列构象变化循环中，净结果是消耗 ATP 能量，将 Na^+ 传送出细胞，而将 K^+ 传送进细胞。乌苯苷在外表面和 $E_2 \sim P$ 的结合，当 K^+ 存在时会抑制其去磷酸，从而阻碍了以上三个过程的正常运行。

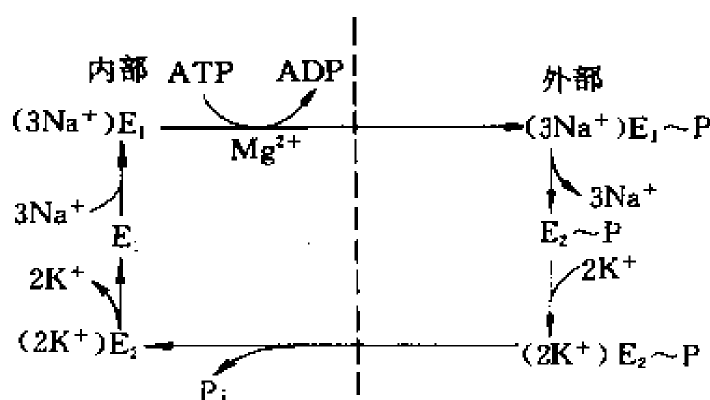


图 5-26　Na^+—K^+ ATP 酶的假设机制

图中用虚线将膜分为内、外表面区。酶的构象至少存在两种在循环变化着，而不是表示跨膜物理移位。

对大肠杆菌的研究中发现，酶体系被 ATP 磷酸化过程是与 K^+ 的通透性（即 K^+ 的传送和积集）相偶联的，它并不依赖于 Na^+，其机制有待进一步研究。

Hodgkin 和 Huxley 等根据细胞膜电势不接近零等情况提出了如下的细胞(膜)电势 $\Delta\varphi_{细胞}$公式,即

$$\Delta\varphi_{细胞}=\frac{RT}{F}\ln\left[\frac{P_{K^+}(C_{K^+})_{外}+P_{Na^+}(C_{Na^+})_{外}+P_{Cl^-}(C_{Cl^-})_{内}}{P_{K^+}(C_{K^+})_{内}+P_{Na^+}(C_{Na^+})_{内}+P_{Cl^-}(C_{Cl^-})_{外}}\right] \tag{5.7-1}$$

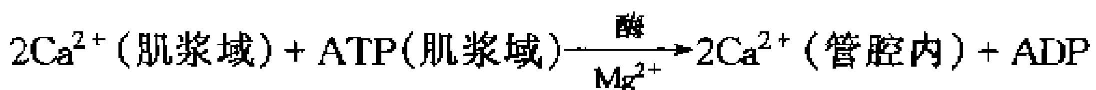
式中 P_{K^+}、P_{Na^+}、P_{Cl^-}——分别代表相应离子透过膜的渗透性能。当外界对膜无刺激(如电场、化学作用和光等任何一种)的"静态"时 $P_{Na^+} \ll P_{K^+}$,P_{Cl^-} 也小,则(5.7-1)式近似地成为仅存在 C_{K^+} 的 Donan 电势,也就是

$$\Delta\varphi_{D}=\frac{RT}{F}\ln[(C_{K^+})_{外}/(C_{K^+})_{内}] \tag{5.7-2}$$

上式是相对稳定的细胞(膜)电势,一般膜外相对为正,常称作"静态电势"。当受到外部刺激时,便会改变 Na^+ 离子的渗透性 P_{Na^+} 而流入细胞内,细胞电势随之发生变化,这瞬间变化的电势称为"动作电势"。然而,刺激作用停止后,渗透性能即可恢复正常,电势也就处于"静态"值。但恢复原状时 Na^+ 又如何从细胞内部的低浓度溶液传送至外部高浓度处并未得到解释。此外,还发现大量 Na^+ 离子输入细胞内引起的细胞(膜)电势变化只有几毫伏,表明(5.7-1)公式的计算值偏差颇大。

5.7.3 Ca^{2+}—ATP 酶及其它离子传送系统

肌肉细胞中有一往往常被称为"肌浆网"的内质网膜,是属于 Ca^{2+}—ATP 酶传送系统。它具有网状管腔(内)面,又有与肌浆域接触的肌浆网外侧面,其中配置着跨膜的并以不对称形式排布的 Ca^{2+}—ATP 酶蛋白。这种细胞器在静息状态下是肌肉中贮藏 Ca^{2+} 之处,当肌肉细胞受到电刺激时,从肌浆网内迅速地释放 Ca^{2+},促使 Ca^{2+} 进入肌浆而触发肌原纤维作收缩运动。随后又通过 Ca^{2+}—ATP 酶的催化传送作用,将 Ca^{2+} 重新摄入网状管腔内,在酶的催化下 Ca^{2+} 传送的反应式为



$$2Ca^{2+}(肌浆域)+ATP(肌浆域)\xrightarrow[Mg^{2+}]{酶}2Ca^{2+}(管腔内)+ADP$$

(肌浆域) + P_i(外侧肌浆域)
关于 ATP-酶传送系统的机制如图 5-27 的示意。

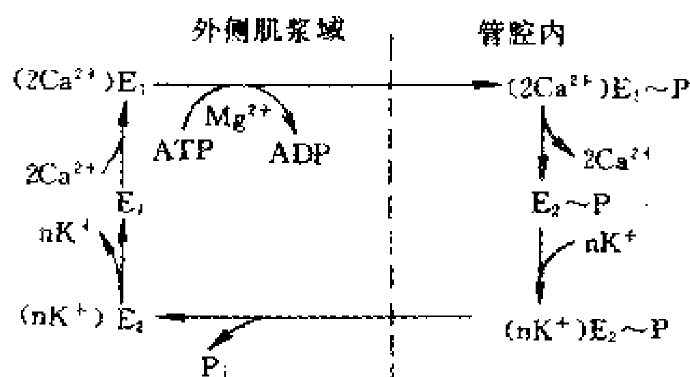


图 5-27 肌浆内质网上 Ca^{2+}—ATP 酶系统的作用机制

图中虚线将内质网分为内、外部，酶的构象变化也相似于 Na^{2+}—K^+ ATP 酶，且也以不对称形式跨膜存在

对 Ca^{2+}—ATP 酶性质的研究发现，在 Ca^{2+} 和 ATP 存在(尚需 Mg^{2+})下，Ca^{2+}—ATP 酶能形成共价磷酸化酶。该酶以催化 ATP 释能作功将 Ca^{2+} 载带跨膜传送入内质网膜管腔内，启动了作用机制沿箭头方向进行。对于能结合 Ca^{2+} 的酶构象与释放 Ca^{2+} 的酶构象相互间转变的循环过程，人们认为 ATP 造成的磷酸化、Ca^{2+} 的结合和 Mg^{2+} 的存在都起了重要作用。但 K^+ 参与反应的情况尚须进一步探讨。不过，Ca^{2+} 在肌浆网中传送时有许多方面与 Na^+ 在动物细胞质膜上的转移相似。

除了上述几例传送系统外，还有：

(一)胃上皮细胞质膜 H^+ 移位酶，它是与胃腔的酸化有关，类似结构的 H^+ 移位 ATP 酶也在真菌和酵母菌细胞中被发现，此酶在传送 H^+ 时也能被瞬时磷酸化。

(二)F_1/F_o ATP 酶(即 ATP 合成酶)在线粒体、叶绿体和一些细菌中的功能似乎相似。电子传递所形成的质子浓度梯度能促使 H^+ 顺着降低其电化学势梯度流过 F_1/F_o ATP 酶作化学功，从而致使 ADP 和 P_i 合成 ATP，可参见图 5-28(a)示意。

F_1/F_o ATP 酶在某些专一性厌氧菌的厌氧生活和缺少呼吸功能的电子传递链细菌中，也有相反方向催化的功能，即水解 ATP 作功，逆 H^+ 浓度梯度泵出质子〔见图 5-28(b)〕。所以也可认为 F_1/F_o ATP 酶是一种利用 ATP 贮存的化学能驱动 H^+ 逆浓度梯度进行初级主动传送的蛋白复合体，但尚未发现 F_1/F_o ATP 酶在转移质子过程中发生共价磷酸化作用。

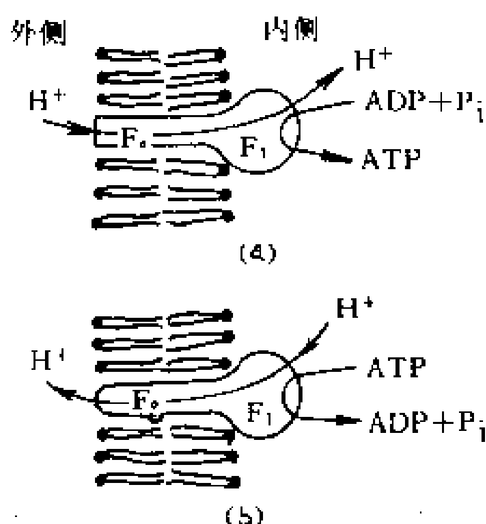


图 5-28 细菌、线粒体和叶绿体膜上 F_1/F_o ATP 酶功能

(a)电子传递产生的质子梯度通过化学渗透偶联以合成 ATP；(b)在厌氧生长细菌中 ATP 水解释能以产生质子浓度梯度

F_1/F_o ATP 酶中 F_1 是由 5 种不同的亚基(α、β、γ、δ、ε 命名)组成，细菌(嗜热细菌 PS3)的 5 种亚基组成的可能是 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ 复合体，通过其中 δ 与 ε 亚基结合着 F_o 可使质子透过 γ 亚基犹似"闸门"控制着质子的传送。

(三)光驱动电子传递的初级主动传送系统的主要功能是：从线粒体或细菌中泵出质子，或者传送质子进植物和藻类细胞的叶绿体内，造成质子浓度梯度作功用于 ATP 生物合成或次级主动传送离子转移。光合作用使叶绿素所吸收的一部分光能驱动的电子传递反应，以形成质子浓度梯度。嗜盐细菌视紫红质也可吸收光能将质子从细胞内主动传送到外部形成质子浓度梯度，从而成为生物合成 ATP 的电化学势能。

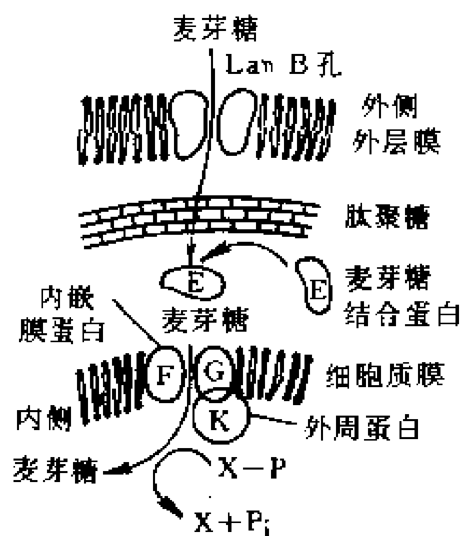


图 5-29 革兰氏阴性细菌结合蛋白系统传送麦芽糖例子的图解

细菌视紫红质的一个赖氨酸残基与一个维生素 A 衍生物视黄醛分子共价结合，其中视黄醛会吸收光子而脱去氮上的质子，于是由最大吸收峰为 570nm 的构象形式转变成在 412nm 处有最大吸收峰的构象形式。随后，视黄醛又会缓慢地质子化而复原。

(四)细菌结合蛋白的初级主动传送系统，例如：大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌等革兰氏阴性细菌生物细胞的周质空间，分布着某些能专一性结合糖、氨基酸和一些无机盐离子的蛋白质传送系统，可见表 5-6。这类周质蛋白本身并不能单独负责传送所识别的分子穿过膜，但当周质蛋白在细胞表面集聚而与跨膜内嵌透性酶相互作用时，却对其专一性内嵌膜蛋白的传送识别分子起了重要作用，于是可以认为它们是组成了结合蛋白体系的传送系统，某些内嵌膜蛋白性质是依赖于结合蛋白体系。表 5-6 中大肠杆菌的麦芽糖传送系统可参见图 5-29。

表 5-6 革兰氏阴性细菌的结合蛋白传送系统

微生物名称	底物	结合蛋白相对分子质量($\times 10^{-3}$)	微生物名称	底物	结合蛋白相对分子质量($\times 10^{-3}$)
大肠杆菌	磷酸盐	41	鼠伤寒沙门氏菌	硫酸盐	31
	亮氨酸/异亮氨酸	36		组氨酸	26
	谷氨酰胺	25		核糖	31
	赖氨酸/精氨酸/鸟氨酸	27	肠炎沙门氏菌	半乳糖/葡萄糖	35
	阿拉伯糖	38			
	核糖	30			
	麦芽糖	37			
	半乳糖/葡萄糖	35			

据其研究结果表明，麦芽糖透过外膜上由 Lam B 基因产物的孔道(也是入噬菌体的受体)后，若要移位穿过细胞质膜，至少就需要 4 种不同的蛋白质，即一种能与外表面上跨膜组分相结合的周质中麦芽糖结合蛋白，通常称其为 mal E 结合蛋白，它既能和外膜上 Lam B

蛋白孔道相互作用,又能和质膜上透性复合物相互作用,这可能对促进跨膜传送过程提供立体专一性作用;另2种可能是媒介传送跨膜内嵌膜蛋白(F和G蛋白);还有一种是位于内表面可能与G蛋白发生专一性结合的K蛋白,K蛋白不仅是基本传送组分,而且能调节传送活性。

透过外层膜的麦芽糖先与周质结合蛋白E相互作用,后由内膜透过酶F和G经一种高能磷酸化合物(如ATP等)供能驱动过程,在K蛋白协同作用下将麦芽糖传送到质膜内侧,由于从上述系统中得到纯化的内嵌膜透性酶是非常困难的,于是对ATP或其它高能磷酸化合物如何供能以驱动结合蛋白系统的主动传送研究还很不够。

5.8 离子浓度梯度和电化学势梯度对膜传送的作用

5.8.1 离子-溶质共同传送系统

线粒体或细菌细胞在电子传送过程中,将质子泵出而形成跨膜的H^+浓度差〔ΔpH〕和电位差($\Delta\psi$,内部为负值),这两种成分都成为电化学势能,即

$$\Delta P = \Delta\psi - \frac{2.3RT}{F}\Delta pH \qquad (4.4\text{-}1)$$

成为质子移位的驱动力(或用pmf代表ΔP)。这种因质子引起自由能变化所作的功可以推动质子流动,在膜蛋白协助下穿越细胞膜或细胞器膜。在F_1/F_0 ATP酶中,由ΔP所推动的H^+流经酶时放出的能量可用于合成ATP的吸能反应;ΔP所驱动的H^+向内流动与细胞吸收某一特定溶质相偶联时,ΔP即可用于驱动主动传送;ΔP提供的自由能有可能促使发生质子的共同(或称并发)传送或推动次级主动传送。P.Mitchell、T.H.Wilson和H.K.Kaback等研究了大肠杆菌乳糖传送系统发现,耗能细胞具有H^+与乳糖的非代谢类似物甲硫基-β-D-半乳糖吡喃糖苷[TMG,图5-30(a)]共同传送的机制,如果

将 TMG 加到耗能细胞的外面，进入细胞内的 TMG 和 H^+ 的比例为 1:1，便会使细胞质酸化。表明大肠杆菌乳糖在细胞内主动累积与降低 H^+ 浓度梯度(或电化学势梯度)而进入细胞内的过程是紧密相偶联的，参见图 5-30(b)。

具有 Na^+—溶质共同传送系统的动物细胞和生活在高浓度 Na^+ 中的嗜盐细菌等某些细菌，也会产生 $\Delta\psi$，因此它们会受到 $\Delta\psi$ 和 $\Delta[Na^+]$ 的影响，但对 ΔpH 不敏感。动物细胞的 Na^+—K^+ ATP 酶会把 Na^+—溶质共同传送系统所泵入的 Na^+，又迅速地泵出细胞，以维持细胞外与细胞内的 Na^+ 浓度呈高比例(图 5-31)。

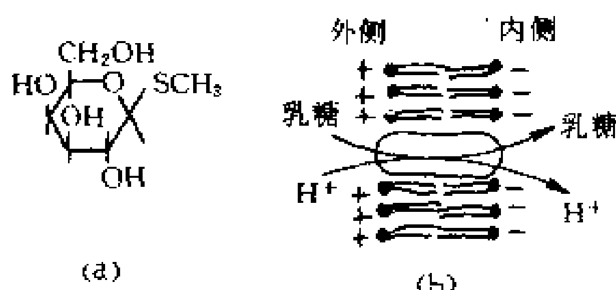


图 5-30

(a)一种细菌乳糖透性酶的非代谢底物 TMG；(b)存在质子梯度或电化学势梯度或乳糖浓度梯度时，乳糖与 H^+ 共同传送的主动累积机制。

通过研究，现已发现具有共同传送功能的一些次级主动传送系统有：真核细胞的中性氨基酸与 Na^+；肠、肾、脉络丛等动物细胞的葡萄糖与 Na^+；大肠杆菌的二羧酸与 H^+ 和脯氨酸与 H^+；大肠杆菌和嗜盐菌的谷氨酸与 Na^+；大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌的密二糖与 Na^+；大肠杆菌和某些其它细菌的乳糖与 H^+；以及嗜热细菌 PS3 的丙氨酸与 H^+ 等。

5.8.2 线粒体 ATP/ADP 交换传送系统

对真核细胞线粒体内合成 ATP 的研究发现，有一种可让 ATP 通过线粒体内膜向外传送，同时又使细胞质中代谢反应产物 ADP 向内输送的专一性功能蛋白质，通常称作 ATP/ADP 交换器，它保证了消耗 ATP 代谢过程主要在细胞质中进行而提供细胞新陈代谢的能量，及线粒体内合成 ATP 的原料 ADP 来源以维护细胞活力。在 pH 为 7 时 ATP^{4-} 与 ADP^{3-} 反向传送中平均多送走一个负电荷，这种过程是一生电过程。由于线粒体膜两侧的膜电位差 $\Delta\psi$(内负、外正)，

虽然细胞质中[ATP]/[ADP]的比值要比线粒体内的高，但仍然有利于它们的反向传送过程，不过要消耗部分的 $\Delta\psi$。

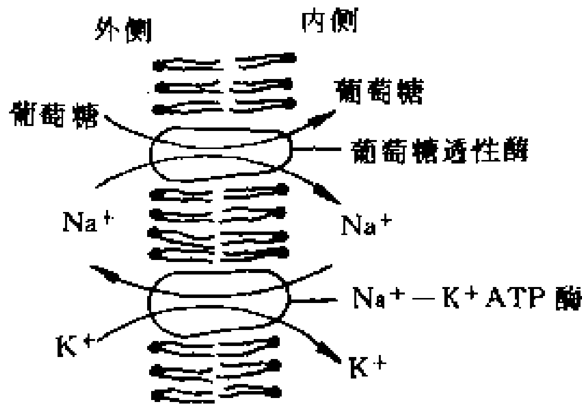


图 5-31 Na^+与糖(或氨基酸)的共同传送是主动累积糖(或氨基酸)的方式

M. Klingenberg 等提纯了 ATP/ADP 交换传送蛋白，它在表面活性剂溶液中是由 2 条相同亚基 30000 相对分子质量多肽链组成的二聚体，其二聚体形式具有了 ATP/ADP 交换功能的活性，倘若将它离解成单体便会失去对传送底物的结合亲和力。每个二聚体表现出只有一个核苷酸结合部位，且不会在膜两侧同时出现，该核苷酸结合部位究竟面对的是膜外侧面还是内侧面？是随二聚体构象变化而呈现的，当此部位面向膜外时，对膜外侧表面的 ADP 亲和力大而对 ATP 的亲和力小；如果此部位转化为向膜内时，则有相反的效果，即对 ATP 的亲和力大而对 ADP 的小。这两构象状态是可以相互转换的，并在结合 ADP 或 ATP 后均可引起构象的这种转化而似乎不需要活化能，参见图 5-32。

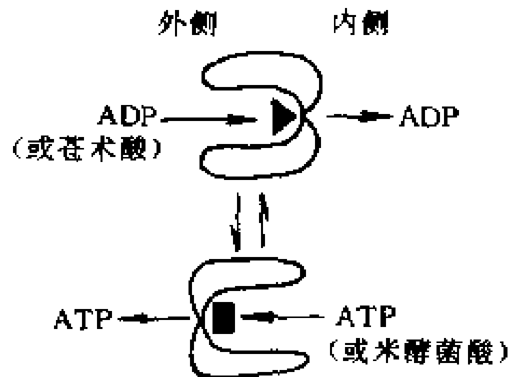


图 5-32 线粒体内膜 ATP/ADP 交换器的交换传送模型

使用毒物苍术酸(能结合于 ADP 要结合的构象部位)和米酵菌酸(能结合于对 ATP 专一性结合的构象部位)，可以证实上述两种构象的存在，并不会发生交叉反应。不过，其中若加入适当的腺嘌呤核苷酸，以上两种构象便可以相互转换。

5.9 人工膜传送系统与半透膜唐南平衡

5.9.1 纯化传送蛋白人工膜传送系统的重建

将分离的透性酶配置于人工膜系统中，使膜传送系统重建，对膜传送机制的研究提供了用实验表征的一较有利之手段。经纯化的特定酶配置于纯磷脂双层中后，就有可能在没有其它膜蛋白或有关的代谢过程干扰下研究特定的单一传送系统的功能。

E. Racker 等曾成功地将参与氧化磷酸化的酶、电子传递酶以及一些传送蛋白配入人工磷脂双层小泡中，这是一种称作配置蛋白质-磷脂小泡的蛋白脂质体重建技术。这些技术是采用在表面活性剂胶束中纯化的膜蛋白与磷脂加在一起，以超声波处理并给予稀释；或者在含磷脂的溶液中透析蛋白质-表面活性剂复合物（见图 5-33 示意），可制备传送某些溶质的蛋白脂质体。

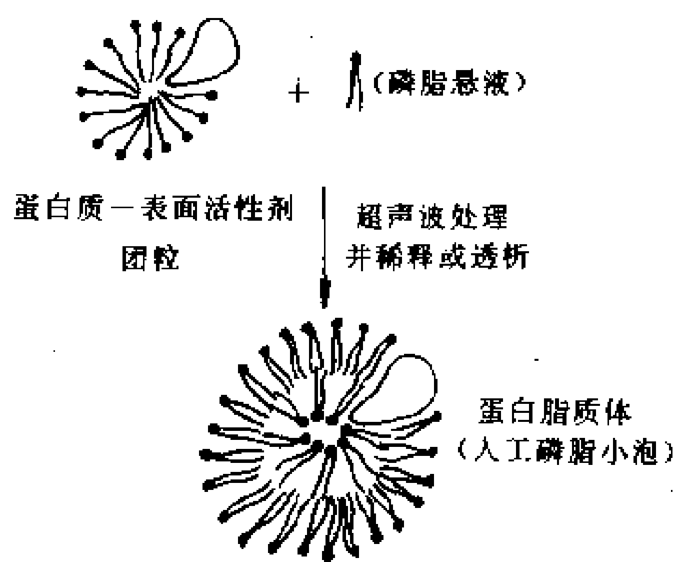


图 5-33　重建蛋白脂质体技术图解

E. Racker 和 W. Stoeckenius 将纯化的细菌视紫红质和线粒体 F_1/F_o ATP 酶同时配置入磷脂小泡的重建蛋白脂质体中，在实验中发现这两种酶分子的位置均分别与它们在细菌和线粒体膜上的方向相反。在光照和两种酶同时存在的情况下，这一些重建的蛋白脂质体能催化小泡外空间的 ADP 与 P_i 反应合成 ATP，见图 5-34，此实验表征了视紫红质的质子泵作用和 Mitchell 的化学渗透假说。这是光照细菌视紫红质所形成的质子浓度梯度驱使

F_1/F_0 ATP 酶催化合成 ATP 反应，因此两种酶缺一不可。

有关实验膜传送功能的研究表明，磷脂对内嵌膜蛋白的结构和功能有密切关系，如果除去结合在酶周围的磷脂分子，就会失去该酶的活性。从兔肾中分离到的 Na^+—K^+ ATP 酶每摩尔需要大约 90 摩尔的磷脂才呈现出该酶的最高活性；纯化的肌浆网 Ca^{2+}—ATP 酶需要的磷脂摩尔比为磷脂∶蛋白＝30∶1，此时才表现出最适宜的功能。因此，在此领域内的研究将推动膜传送生物物理化学的进一步发展。

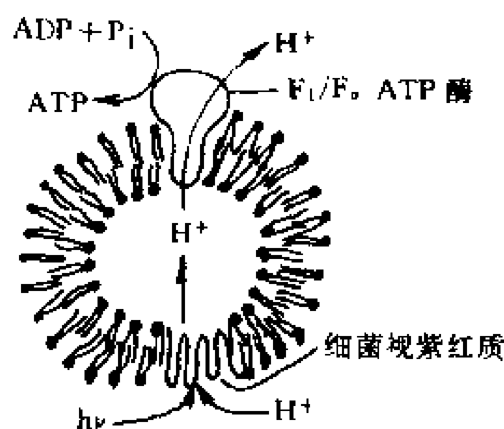


图 5-34　Racker 和 Stoeckenius 的重建实验

现在还有一种人工膜重建的方法，即在重建平面磷脂双层内配置纯化的透性酶（见图 5-35 装置），实验仪器具有一盛水溶液容器，由一含圆孔的薄隔板将此容器分隔成两部分，并装有直流电源、电极和记录仪等，实验前把溶于有机溶剂的磷脂溶液涂在此装置的薄壁孔上，几分钟后磷脂双层便会在装有水的容器分隔薄壁孔上形成。如果将蛋白质-表面活性剂或蛋白质-脂质复合物加入分隔的任一水域中，膜蛋白便会被配置到磷脂双层上（加至不同的水域时，酶可能会有不同的取向）。若将磷脂和特定研究的蛋白酶预先混合在一起，然后，把它涂于薄壁孔上同样可以形成膜双层。这种重建膜双层的方法和装置，利于控制和测量膜双层两侧溶液的成分以及测量重建膜双层的电位和通量。所以这种系统具有比制备蛋白脂质

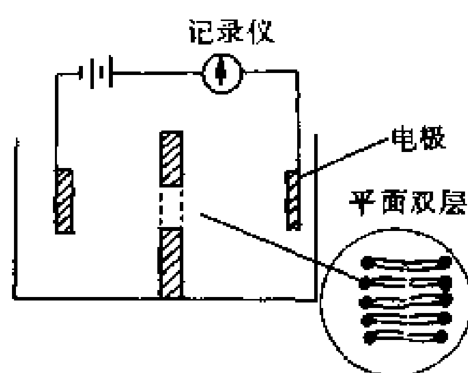


图 5-35　重建平面脂双层的实验装置截面图解

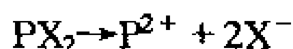
体方法较多的优点。当研究对膜电位敏感的传送蛋白时，可以容易地在脂双层两侧加上跨膜电压；在研究带有净电荷的传送物质中，可监察电流的流动以连续测定物质的传送；在某些情况下，能控制重建蛋白在脂双层中的取向；运用这种平面双层系统有可能进一步研究某些溶质传送泵和载体的性质和功能。

当平面脂双层膜中在一个方向上配入细菌视紫红质，便会对照射膜孔上的光能作出响应，可将质子泵入其装置中的另一侧槽内，于是呈现了电位。如果将一种纯化的大肠杆菌六聚体微孔蛋白制品配置到平面脂双层上，当外加电位差(开始时 240mV)到了膜上后，便能测定其离子电流。这种电流约经 5 分钟之后便在某一稳定态值上下分段起伏波动，这是由于重建膜上微孔蛋白通道关闭或开启之故。可形成微孔通道的抗生素短杆菌肽 A 配置到平面脂双层系统中，也能获得相似的实验结果。这些均是微孔蛋白闸孔式作用的表征。

值得注意，现在能重建的膜为人工系统，以纯化的传送蛋白“活性”状态配至蛋白脂质体或平面脂双层上，然后由某一实验测定的信息，并不一定能在“真实”生物膜条件下必然呈现，所以务必对整个细胞和完整的生物膜进行观察。不过，这些重建技术的开拓，将有利于探索有关生物膜传送机制方面目前许多尚未解决的课题。因此，膜的功能、装配和传送机制仍是生物物理化学学科方兴未艾的研究领域。

5.9.2 半透膜唐南(Donnan)平衡

生物学所感兴趣的大多数聚合物是或强或弱的带电聚合电解质，例如核酸、聚左赖氨酸以及蛋白质类的两性聚合电解质等。如果膜平衡中涉及强的聚合物电解质行为，即



$$PX_2 \rightarrow P^{2+} + 2X^-$$

假设系统中仅有聚合阳离子 P^{2+} 及其反号一价小阴离子 X^-，同时处于只能透通小阴、阳离子和溶剂(S)的半透膜内侧(α 相)，而膜外侧(β 相)却注入溶于相同溶剂的同种阴离子 1∶1 电解质($BX \rightarrow B^+ + X^-$，参见图 5-36)。此时建立的跨膜平衡需要膜两侧各离子电化学

势($\bar{\mu}_i$)相等，即

$$\bar{\mu}_{B^+}^{\alpha}=\bar{\mu}_{B^+}^{\beta}、\bar{\mu}_{X^-}^{\alpha}=\bar{\mu}_{X^-}^{\beta}和\bar{\mu}_S^{\alpha}=\bar{\mu}_S^{\beta} \quad (5.9\text{-}1)$$

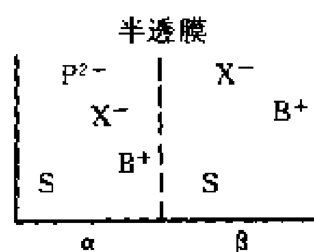


图 5-36 Donnan 平衡

若溶液是理想的，电解质 BX 或各离子的化学势公式为

$$\mu_{BX}=\mu_{BX}+RT\ln C_BC_X 或 \mu_i=\mu_i^{\ominus}+RT\ln C_i \quad (5.9\text{-}2)$$

式中 C_i——分别表示 B^+ 或 X^- 的量浓度(C_B 或 C_X)；

$\mu_i^{\ominus}$——为 i(即 B^+ 或 X^-)的标准态化学势。

为了保持溶液的电中性，膜两侧溶液中各离子的量浓度间必然分别建立以下数值关系

$$Z[P^{2+}]^{\alpha}+[B^+]^{\alpha}=[X^-]^{\alpha},[B^+]^{\beta}=[X^-]^{\beta} \quad (5.9\text{-}3)$$

电化学势是化学势 μ 与静电位能 $Zie\varphi$ 之和，即

$$\bar{\mu}=\mu+Z_ie\varphi \quad (5.9\text{-}4)$$

于是膜两侧溶液中各小离子和溶剂有如下关系式(其中阳、阴小离子的体积可忽略不计)：

$$RT\ln(B^+)^{\alpha}+F\varphi^{\alpha}=RT\ln(B^+)^{\beta}+F\varphi^{\beta} \quad (Z_i=1) \quad (5.9\text{-}5)$$

$$RT\ln(X^-)^{\alpha}-F\varphi^{\alpha}=RT\ln(X^-)^{\beta}-F\varphi^{\beta} \quad (Z_i=1) \quad (5.9\text{-}6)$$

$$RT\ln(S)^{\alpha}+P^{\alpha}V_S=RT\ln(S)^{\beta}+P^{\beta}V_S \quad (5.9\text{-}7)$$

式中 P ——代表溶液所受的压力；

V_S ——代表溶剂体积；

F ——代表法拉第常数。

如果将(5.9-5)与(5.9-6)两式加和便可得

$$C_B^{\alpha}C_X^{\alpha}=C_B^{\beta}C_X^{\beta} \quad (5.9\text{-}8)$$

结合(5.9-3)和(5.9-8)两式即可得

$$C_B^{\alpha}C_X^{\alpha}=(C_B^{\beta})^2=(C_B^{\alpha}+ZC_P^{\alpha})C_B^{\alpha} \quad (5.9\text{-}9)$$

$$C_B^{\beta}C_X^{\beta}=(C_X^{\beta})^2=C_X^{\alpha}(C_X^{\alpha}-ZC_P^{\alpha}) \quad (5.9\text{-}10)$$

或

$$C_B^\alpha - C_B^\beta = \frac{-ZC_P^\alpha C_B^\alpha}{C_B^\alpha + C_B^\beta} \tag{5.9-11}$$

$$C_X^\alpha - C_X^\beta = \frac{ZC_P^\alpha C_X^\alpha}{C_X^\alpha + C_X^\beta} \tag{5.9-12}$$

上述公式表明了所有离子在膜两侧溶液内分布的浓度关系。聚合阳离子的反号小离子(X)将更多些存在于膜内侧含聚合阳离子的溶液中,同理倘若聚合电解质离子是阴离子,则其反号小阳离子也将更多些集中在膜内侧溶液中。

由(5.9-5)和(5.9-6)两式可以给出

$$\Delta\varphi = \varphi^\alpha - \varphi^\beta = \frac{RT}{F}\ln\frac{(B^+)^\beta}{(B^+)^\alpha}$$

$$= \frac{RT}{F}\ln\frac{(X^-)^\alpha}{(X^-)^\beta} \tag{5.9-13}$$

式中 $\Delta\varphi$——代表唐南(Donnan)电势(ψ_D)。

由于上例的讨论对膜及膜两侧α相与β相溶液采用了简单化和理想化的假设,则避免了讨论问题的复杂化。由此尚可清晰地看到,膜离子在膜两侧不均一的分布会引起膜电势,便可自然地理解到膜电势的产生。

一般,生物体内一些过程在热力学意义上大多是不可逆的,这些系统是离开了平衡态的,然而绝大部分经典热力学的公式是用于可逆过程和处于平衡的系统。不过,如果不去描述溶质分子每个时刻的经历和所发生过程的精细图像,平衡热力学方法仍可扩大而用于某些离平衡不太远的系统。可以想到内嵌蛋白质的带电膜也必然会产生表面电势,这与生物膜的性质和功能有着重要关连。

若将(5.9-7)式整理成半透膜两边溶液的渗透压(π)公式,即

$$\pi = P^\alpha - P^\beta = (RT/V_S)\ln[(S)^\beta/(S)^\alpha] \tag{5.9-14}$$

式中 V_S——代表溶剂的体积;

R ——代表气体常数。

对于海生鱼类而言,维持细胞膜内外所产生的适当渗透压是生存的

关键条件之一。

倘若按溶质与渗透压的关系可写出渗透压(π)关系式为

$$\pi = RT\{C_P^s + (C_B^s - C_B^\beta) + (C_X^s - C_X^\beta)\} \qquad (5.9\text{-}15)$$

式中　C_P、C_B、C_X——分别代表聚合电解质阳离子、小阳离子和阴离子的摩尔浓度(即每 cm^{-3}含 n 摩尔)。

此公式是根据麦克米兰(Mc Millan)和麦耶尔(Mayer)1945 年所提出的渗透压公式:

$$\pi = RT(\frac{C}{M} + BC^2 + DC^3 + \cdots)$$

该式(C 的单位是克/cm^3)是在稀溶液中简化和演变而得的。

在高浓度盐和低浓度聚合电解质的情况下,假定 1:1 电解质盐的 C_X^β、C_B^β、C_X^s 与 C_B^s 四者逼近于相等,那么将(5.9-11)和(5.9-12)两式代入(5.9-15)式,并利用(5.9-3)式关系整理便得出

$$\pi \simeq RT[C_P^s + Z^2(C_P^s)^2/4C_B]$$

$$\simeq RT[\frac{C_P}{M_P} + Z^2(C_P)^2/4C_B\overline{M}_P^2] \qquad (5.9\text{-}16)$$

式中　C_P——代表系统内强聚合电解质的重量浓度(克/cm^3);

$\overline{M}_P$——代表该聚合电解质的数均摩尔质量。

此渗透压公式可用于测定某些强聚合电解质或远离等电点的蛋白质等数均相对分子质量的计算。由于高浓度盐使 C_B 变得很大时,右括号中的第二项趋于很小而渗透压和右括号中第一项数均相对分子质量趋于理想值。

结　束　语

生物膜的组成、结构和装配,以及膜具有的物理化学性质是与生命活动密切相关。细胞吸取营养和获得能量,处理和排泄有害物质或废料,细胞的新陈代谢(生长、分化和繁殖)等都有膜蛋白的参与。因此,维持适当的膜脂成分作为高选择透性屏障,以保证生物膜呈现

出应有的功能，并提供各种功能的膜蛋白有一定活动环境，可让膜蛋白应答需要而变构和现出特异的活性，从而发挥它们各自专一性功能，这是与生命过程有关的研究课题。

若膜上摄入使脂双层（或质膜）呈现不正常物理化学性能的物质，例如膜中含了过高浓度胆固醇，就会限制磷脂双层中膜成分的流动性而引起膜"硬化"，最终导致细胞的衰老而失去其应有的功能。又如将一些重金属（例 Pb 等）摄入，经肠道吸收，与膜中有关酶结合而使该酶失去正常催化活性，便影响细胞正常的新陈代谢作用而可能变异。可见生物膜与生命活动的正常进行有着极为密切的关系。

第六章　生物学测试中的物理化学方法

要了解遗传如何起作用、细胞如何制造蛋白质、蛋白质如何调节新陈代谢、肌肉如何收缩等等，就必须掌握物理化学的理论和方法。这是由于在样品的制备、分离、鉴定过程以及对样品的结构和构型分析中，透析、扩散、沉降、电泳、电子顺磁共振、X射线衍射等方法均是常被采用的，而这些方法都是属于物理化学的范畴之故。

6.1　物理化学的分离或鉴定技术

利用各类蛋白质分子在物理或化学性质上的差异，有可能将其进行分离和纯化。

6.1.1　蛋白质等电沉淀和盐析

蛋白质具有表面含带电氨基酸侧基的特点，而氨基酸侧链是呈现弱酸性和弱碱性的离子特征基团，其各个侧链贡献出的电荷组成蛋白质所带的总电荷。在特定的pH条件下，侧链上所带正电荷之和正好等于其所带负电荷之和，蛋白质所带净电荷为零。此时pH值(即蛋白质的等电点pI)使蛋白质的溶解度降低至最低点，由于不同种类的蛋白质有可能具有的等电点不同，这就给不同等电点的蛋白质提供了等电沉淀粗分离的方法。

蛋白质的溶解度随溶液中离子环境的不同也会发生增减，但盐溶和盐析效应是复杂的。例如，氯化钠的浓度在一定范围内增加能使β-乳球蛋白的溶解度增大，这是离子强度对蛋白质溶解度的影响。离子强度(I)定义为溶液中各i离子摩尔量浓度与i离子所带电荷平方的乘积加和之$\frac{1}{2}$，即

$$I=\frac{1}{2}\sum_{i}C_iZ_i^2 \tag{6.1-1}$$

式中 C_i——代表i离子的量浓度；

Z_i——代表i离子所带的电荷数。

蛋白质上每一带电的位点会使感应所及范围内集积离子氛，此离子氛的有效半径($1/\kappa$)与溶液离子强度(I)的平方根成反比关系：

$$1/\kappa=1/(\frac{2000e^2LI}{\varepsilon_o\varepsilon_r kT})^{1/2} \tag{6.1-2}$$

式中 e ——代表电子电荷；

L ——代表亚佛加德罗数；

k ——代表 Boltzmann 常数($\frac{R}{L}$)；

T ——代表绝对温度；

ε_o、ε_r ——分别代表真空介电常数($\varepsilon_o=8.854\times10^{-12}$法/米)和介质的相对介电常数(SI 制)〔c、g、s 制介质的介电常数 $\varepsilon=4\pi\varepsilon_o\varepsilon_r$〕。

25℃ NaCl 的 C=0.01 摩尔/升时，$1/\kappa=3.04$nm，C=0.001 摩尔/升时 $\kappa^{-1}=9.61$nm。可见离子强度增加能使 $1/\kappa$ 离子氛有效半径减小，蛋白质周围由较浓的离子氛包围，使分子上带相反电荷的位点不易相互作用形成静电复合物而沉降，于是选择适当电解质以增加离子强度，可增加某些蛋白质(如β-乳球蛋白)在水中的溶解度。

还有些盐类(如高浓度硫酸铵)的加入，会使一些蛋白质的溶解度降低而呈现盐析现象。蛋白质具有特定的盐析点(即在某一盐浓度下易逃逸溶液沉淀)，利用此性质而选择适当的电解质，并调节溶液 pH 值，便能将蛋白质进行粗级分离和抽提。

值得注意，大多数球蛋白的表面上每个可解离的侧链都有一个特定的 pK 值(或离解平衡常数值)，在特定环境中也会引起氨基酸侧链 pK 值的变化；另外，环境的影响可使部分氨基酸侧链埋入螺旋或折叠形成的蛋白质表面内，从而削弱了环境中质子与其建立离解平衡的倾向。这样就会导致对 pK 值、表面所带电荷量等的干扰，实

际上造成了蛋白质带电荷上的变化。不过，如果利用得当，这种变化所引起的蛋白质电荷性质上的差异，也可成为许多种蛋白质分离鉴定方法的基础。

6.1.2 凝胶电泳和等电汇聚

(一)电泳基本原理

带电荷粒子在外加电场中泳动输送称为电泳。它与大分子所带电荷比其质量更有密切关系，于是提供了一种分离和分析带电混合物的重要手段。但实际测试中存在着一些复杂性，通常主要是大分子水溶液中还含有反号离子或缓冲剂离子和盐类，这些离子会与带电荷大分子相互作用，并影响电场对大分子的作用。有关电泳的基本原理，可以利用孤立的带电粒子在非导体介质中的简化情况阐明。

假定电场所产生的力突然施加在带电粒子上，引起该粒子加速输运到一定速度，正好使所施加的驱动力与介质的粘滞阻力平衡，该粒子得到恒速，它受到电场的力(习惯用 c、g、s 制的达因表示，化成 SI 制 1 达因 $=10^{-5}$ 牛顿)可由库仑定律得出：

$$F = ZeE \tag{6.1-3}$$

式中　Z ——代表粒子所带电荷数(以电子为单位)；

e ——代表电子电量(4.8×10^{-10}静电单位，SI 制中 1 库仑为 3×10^{9} 静电单位)；

E ——代表电场强度，以每厘米静电单位电势表示(SI 制中以伏特/米或牛顿/库仑为单位，一个每厘米静电单位电势 $=100\times300=3\times10^{4}$ 伏特/米)。

粒子的运动速度 v 为

$$fv = ZeE \tag{6.1-4}$$

式中　f ——摩擦因子。

如果以每单位场强引起粒子电泳速度(即 v/E)表示电泳迁移率 U，当粒子为球形时，则 f 可应用斯托克公式：

$$f = 6\pi\eta R$$

表示，于是可得

$$U=\frac{Ze}{6\pi\eta R} \tag{6.1-5}$$

式中　R ——代表粒子半径；

　　　η ——代表溶剂粘度。

此公式表明，单位场强粒子运动速度与该粒子所带的电荷数成正比关系(由此可了解粒子所带电荷数)，还受到粒子半径的影响(即运动速度与粒子有效体积成反比，提供了可了解粒子大小形态的信息)。但实际情况复杂得多，粒子的非球形和水合作用，大分子离子周围的离子氛所造成的各种形状与环境都会影响而引起上述公式的偏差。虽然对此公式作过一些修正，例如：

$$U=\frac{Ze}{6\pi\eta R}\frac{\chi(\kappa R)}{1+\kappa R} \tag{6.1-6}$$

式中　κ ——代表 Debye-Hücke 理论中提到的离子氛半径的倒数。

离子强度(I)大时，离子氛紧缩在大分子离子的周围；I 小时离子氛扩展开来。函数 $\chi(\kappa R)$ 称为亨利函数。当 κR 从零变到无穷时，它在 1.0 到 1.5 之间变动(见图 6-1)。还有些更复杂的修正表达式，但其结果远不能令人满意。

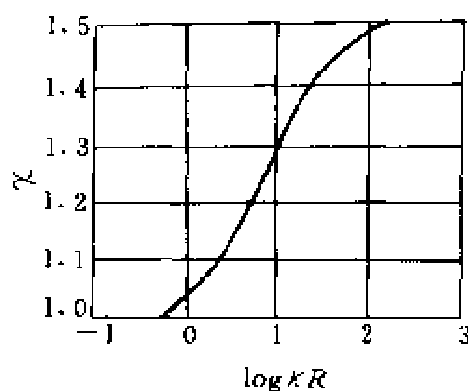


图 6-1　亨利函数

对于根据大分子离子(如蛋白质等)所带净电荷的差异，用电泳技术分离各类带电荷大分子是一种很好的方法。该方法还能用于测定蛋白质或其它聚合两性电解质的等电点 pH 值，它们在某 pH 使所带电荷为零时，U 应等于零；在比等电点低的 pH 值条件下蛋白质应带正电而向负极移动；在比等电点高的 pH 值条件下蛋白质带负电而向正极移动。

(二)凝胶电泳

通常，凝胶电泳是在适当支持介质例如琼脂凝胶或聚丙烯酰胺

凝胶(也有用淀粉凝胶或滤纸类的)所制成的平板或胶柱中进行(见图 6-2)。所用凝胶百分含量是按要分离的蛋白质大小来选定,增加凝胶浓度会使蛋白质的迁移率减小。所以常利用沿平板长度连续增加凝胶百分含量的梯度胶来实现精细分离。电泳实验完成后,可将凝胶边条切下,并将所取得的边条用能与蛋白质反应的染料染色,就能确定剩余的凝胶上蛋白质各分离区带的位置,然后分别将各区带切下,并把各区带上蛋白质组分依次洗提下来,便可得到分离的各类蛋白质。

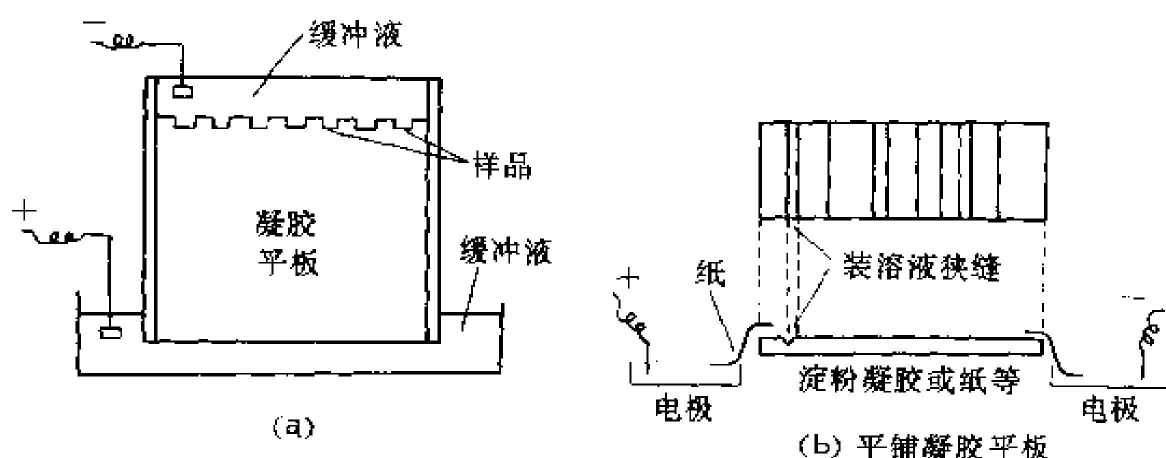


图 6-2 各种凝胶电泳装置

(a)带负电蛋白质例;(b)带正电蛋白质例。样品槽或狭缝位置可根据大分子粒子带电情况选定切成

凝胶电泳技术比溶液中运动界面电泳法优越得多,然而人们又对聚丙烯酰胺凝胶电泳作了改进,以提高凝胶的分辨率。此法特点是将凝胶分为上、下两层而制得。上层凝胶(称堆积胶)的聚合程度通常比下层凝胶(称分辨胶)要小而孔径较大,并调节堆积胶中溶液的 pH 值与分辨胶中的不同,使待分离的蛋白质在堆积胶中的迁移率比分辨胶中的大,导致快速移动而透入堆积胶成为较稀的蛋白质混合物,当泳入分辨胶时会挤集成一条狭的区带,然后在分辨胶中以电泳速度快慢而分离各类蛋白质。通常,电泳分离使用的一些介质情况见表 6-1。

表 6-1　电泳分离法通常使用的介质信息

介质	条　件	优　点	缺　点
纸	滤纸用缓冲液润湿，安放在电极之间	迅速，简单，只需小量待测溶质	可能因蒸发和内渗现象干扰
淀粉凝胶	用部分和水的淀粉塑造凝胶，两端以滤纸引接导电液	分辨能力高，用途广	对大分子运动可能有些阻碍，还有吸附和吸收样品移去较困难
琼脂凝胶	似淀粉凝胶，但成胶剂更稀	开放性结构，造成极接近于溶液电泳法中自由电泳的条件	由于凝胶常带负电，与带正电溶质有较大的相互作用，在 pH 大于 7 溶液中有内渗现象
聚丙烯酰胺胶	在小管中使丙烯酰胺聚合和交联	分辨力好，易于使用，很少内渗现象而可略	通常限于小规模，因电阻低而电流较大

(三)等电汇聚

对蛋白质的分离和鉴定技术的探讨中，还发展了一种常用的方法是等电汇聚，它利用不同类蛋白质具有不同等电点的特征，在电场作用下的一 pH 梯度溶液中分离而形成一些稳恒带。该方法是先将含有几种称为两性电解质的带电有机分子溶液浸入凝胶，并置于电场中，经过一段时间后，便会按两性电解质分子所带电荷相对多少而连续分布于电场中，导致从溶胶的一端到另一端形成了一个连续的 pH 梯度。此时将待测蛋白质溶液加到凝胶内，蛋白质即刻在电场中泳动，直至分别到达两性电解质所产生的 pH 梯度中正好等于各自等电点的位点时，它们所带净电荷分别变为零而停滞不动。因此，等电汇聚技术既可精确地测定蛋白质的等电点，也可对等电点仅差百分之几 pH 单位的蛋白质实现良好的分离。

等电汇聚常使用凝胶柱，可将形成的蛋白质带通过阀门排放，用水套保持凝胶柱一定温度。进行这种灵敏的分析实验务必注意几个

主要条件：

要形成明显而狭的蛋白质分离带区，必需使装置中的溶液有密度梯度存在，以防止蛋白质产生对流，一般是采用不会带电的蔗糖密度梯度而避免干扰电场；

务必建立相当稳定的 pH 梯度，巧妙的方法是将低相对分子质量的聚合两性电解质混合物注入凝胶中，在电场中它们都会泳向各自的等电点，并停置在此位点，使这位点处的 pH 稳定在特定之值，最酸性的低相对分子质量聚合两性电解质将汇集在阳极附近，而最碱性的靠近阴极，于是建立了一稳定的 pH 梯度。

任何蛋白质分子泳到它所属的等电区域，便集中成窄带，这些带可以稳定相当长的一段时间。不过，蔗糖的密度梯度因扩散最终必然要消失，蛋白质的扩散也势必影响到带的稳定性。

(四)SDS 凝胶电泳

此法是在待测蛋白质混和物中加入表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)和巯基乙醇，并短暂地加热，使这些蛋白质混合物完全变性。这是由于 SDS 分子的尾部非极性的脂肪链与蛋白质的疏水基团能以疏水力结合，巯基乙醇又与蛋白质在进行二硫互换反应过程中能断开所有胱氨酸上的二硫键，使蛋白质钛链伸展，于是蛋白质即可结合较多的 SDS 分子。每结合一个 SDS 分子，在变性蛋白质复合物上便会增加两个负电荷，结合的表面活性剂使之带上大量的带电基团，有效地掩盖了蛋白质天然状态时所带的电荷。结合的表面活性剂分子总数与蛋白质的肽链长度或与此相对应的蛋白质相对分子质量成正比。

当上述蛋白质的变性溶液在聚丙烯酰胺凝胶存在时，在外加电场作用下其泳动速度也近似地与相对分子质量大小成比例。

SDS 凝胶电泳在测试未知样品的电泳行为时，同时需要有已知相对分子质量的标准样品进行电泳标定，从二者的比较中取得蛋白质相对分子质量的信息。SDS 凝胶电泳法所测得的相对分子质量近似数据与实验条件有关，但实验操作简单，分辨力高，已广泛用于蛋

白质混合物中各种不同组分的鉴定。对于通常不溶性的膜蛋白，如果没有对其增溶的表面活性剂之存在，那是很难处理的。

（五）其它的各种电泳法

如果将蛋白质溶于缓冲溶液并置于电泳测试管中，两端加有等电导率的缓冲溶液后，插入正负电极，即可通直流电进行电泳，此法称自由界面电泳；若将蛋白质溶液点在浸了缓冲溶液的滤纸（作支持物）上进行电泳的方法，则称之为纸上电泳（或区带电泳）；上述的凝胶电泳（如以淀粉、琼脂、聚丙烯酰胺等作支持物），还有各类测试方案，例如在玻璃管中，将蛋白质的不同组分分离成圆盘环状，常称圆盘电泳，或在铺有凝胶的玻板上进行电泳，称作平板电泳。一般，实验室多采用较简便的纸上电泳或凝胶电泳。目前临床化验人的血清蛋白质组分时就常用纸上电泳法。各种蛋白质和人的血清中含有的清蛋白、α_1-、α_2-、β-和 γ-球蛋白等的等电点数据见表 6-2。利用人血清中各种球蛋白的等电点不同而在 pH 为 8.6 的缓冲溶液中都以阴离子状态存在，进行纸上电泳时都向阳极移动，由于它们所带的电荷数目和相对分子质量不同，电泳进行了一定时间后，各种蛋白质便彼此分离开。停电后即可染色而区分出各自明显的区带（见图 6-3）。

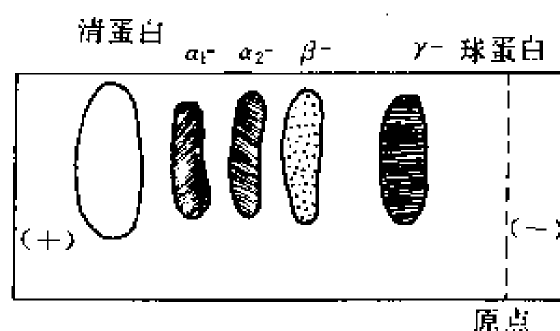


图 6-3　我国正常人血清蛋白质纸上电泳图

表 6-2　几种蛋白质的等电点

蛋白质名称	等电点	蛋白质名称	等电点	蛋白质名称	等电点
鱼精蛋白	12.00～12.40	鸡蛋清蛋白	4.55～4.90	人血清 α_2-球蛋白	5.06
胸腺组蛋白	10.8	牛胰蛋白酶	5.0～8.0	(300000；7.65%)	

续表

蛋白质名称	等电点	蛋白质名称	等电点	蛋白质名称	等电点
溶菌酶	11.0~11.2	胃蛋白酶	1.0~2.5	人血清 β-球蛋白	5.12
细胞色素 c	9.8~10.3	人血清清蛋白(69000；56.7%)	4.64	(9 万~15 万；11.53%)	
血红蛋白	7.07			人血清 γ-球蛋白	6.35~7.30
牛胰岛素	5.30~5.35	人血清 α_1-球蛋白	5.06	(156000；20.30%)	
明胶	4.7~5.0	(200000；3.74%)		人血清 γ_1-球蛋白	5.8~6.6

括号中前项是相对分子质量，后项是含总量中百分比。
蛋白质分子含碱性氨基酸(例精氨酸)较多时，其等电点偏碱，含酸性氨基酸较多的，则其等电点偏酸

6.1.3 层析分离技术

层析分析技术已发展成多种方法，现分别介绍如下：

(一)离子交换层析

此方法是根据各类蛋白质或氨基酸与固定在柱内的离子交换树脂具有不同的亲和力，致使溶液中不同类蛋白质或氨基酸在柱中流下快慢各异而分离成一个个带区。由于蛋白质分子较大，一般无法穿过树脂颗粒(但也有例外)，这与氨基酸有着显著的差别。所以分离蛋白质极少使用交联树脂，通常是用带正电荷基团或负电荷基团的细粉纤维素填充层析柱。还有在一定的盐浓度下，蛋白质不同于氨基酸与树脂的结合有一平衡过程，它可以是完全结合或根本不结合，如果改变盐浓度，就可以将结合在纤维素柱上的蛋白质洗脱(梯度连续洗脱或分段不连续洗脱)。

(二)凝胶层析技术

该方法是利用链与链间交联度不同的天然多糖和人工合成多聚物，它们形成的颗粒具有不同孔径的特点。加入凝胶中的蛋白质混

合物，低相对分子质量的蛋白质很小容易穿人颗粒内部，比孔径较大的蛋白质就不能穿人颗粒内部，将会从颗粒间空隙流过。例如，以相对分子质量为 10000 和 50000 的蛋白质混合溶液加入到平均最大孔径为 3.0nm 多糖颗粒柱中后，混合液的最终体积 V_T 等于充满颗粒内部所需的溶液体积 V_i 和充于颗粒间空隙的溶液体积 V_o 之和（$V_T = V_i + V_o$）。低相对分子质量的蛋白质是均匀分布在 V_T 内，而较大的蛋白质只能集中在 V_o 中，经简单过滤将颗粒间隙中的溶液与颗粒分开，便可按相对分子质量大小使蛋白质得到某种程度的分离。若将此分离过程重复多次，最后能使较小蛋白质的浓度在 V_o 中近似于可忽略程度。

如果将凝胶颗粒充填在柱内，让蛋白质溶液连续地流过此柱，设计凝胶柱有适当的高度，较小蛋白质流过颗粒时，开始均匀分布在 V_T 中，由于穿过颗粒时不断地滞流于颗粒内，对较大蛋白质仅能较快地流过颗粒间空隙而限于 V_c 内。于是在柱底部最早流出的 V_o 几乎只含有较大的蛋白质。通过颗粒孔径大小的分级选择，就能使大小不同的蛋白质分子以不同速度流经层析柱，可以得到蛋白质混合物的洗脱谱（相对分子质量-洗脱体积关系曲线）。利用已知蛋白质相对分子质量的混合物对层析柱进行标定，即可测定未知蛋白质混合物的相对分子质量分布及其大小分级的平均相对分子质量。

（三）亲和层析

利用蛋白质特异结合性对特定的蛋白质进行鉴定是亲和层析法的特点。由于具有特异性结合能力赋予蛋白质分子各种功能特性，又在于特异结合作用的多种多样导致此方法不拘一格而使分离和鉴定具有高效能。

例如，发现许多酶能与腺苷三磷酸或吡啶核苷酸等有机辅助因子可逆地结合，而催化其底物发生化学反应。于是利用此特点，先将树脂与某一种合适的辅助因子的衍生物进行化学反应，然后制成层析柱，当蛋白质混合物在共价结合辅助因子的树脂层析柱内流过时，与辅助因子有特异亲和力的分子被结合在柱上，而其它成分的分子

会从柱中流出。随后用含可溶性辅助因子的溶液洗涤层析柱，便能将与可溶性辅助因子结合的蛋白质从柱上洗脱下来。

又如对于糖蛋白(以化学方式结合糖基的蛋白质)，通常是先将能与多糖结合的蛋白质(例如伴刀豆球蛋白)通过反应共价结合在树脂上，然后制成层析柱，并用适当的糖溶液洗脱下来，便达到了分离的目的。

(四)高效液相层析(HPLC)

它利用层析柱中凝胶内部具有不同孔大小和形状，并均匀混合填充在柱内，进入层析柱的蛋白质除了大于各类孔洞的只能在凝胶粒间隙空间流过外，其它的可分别流经大于它们的孔洞，由于毛细效应和吸附作用对于进入孔洞的蛋白质产生相应的滞后流出影响，适应于进入越小孔洞的蛋白质，滞留的时间越长(即孔径越小，滞留作用越大)，于是根据经层析柱先后淋出的溶液体积可以将蛋白质分级分离，进而可测得蛋白质混合物的相对分子质量分布。

如果采用适当长度的层析柱，凝胶粒度合适、均匀，孔径分布合理，堆积紧密，那么这种按体积大小进入相匹配孔洞的几率越大，柱的分离效果则越高。因此，高效液相层析所用的材料通常要求具有较强的物理强度和更为精细(即孔洞大小能承受很高压力 351～703kg/cm^2，而其结构及分布能更好地满足分级分离的需要)的颗粒组成，柱装置本身也要考虑到能承受高压。这样就可施以很高的液柱静压而改善精细材料柱所带来的流速，不致于使流速减得太慢。所以合理地设计层析柱和正确运用该方法，将可得到很好的分离效果。

6.2 获得大分子的相对分子质量信息之方法

6.2.1 渗透压法的运用

渗透压法一般是将含有蛋白质溶液置于半透膜的内侧，这种膜只允许溶液中水和盐或缓冲液透过，而蛋白质等大分子不能透过。

由于水和盐等透过，在半透膜含蛋白质的内侧液柱升高，将存在一较高的静液柱压力，当压力与渗透力达平衡后，即可对内侧溶液在毛细管中上升的高度进行测量，这个静压力便是渗透压(π)。渗透压(π)与蛋白质浓度 c(以克/升表示)的关系式可从半渗膜两侧，即外侧溶液(一般是考虑纯溶剂水)与内侧含蛋白质的溶液组分水的渗透平衡化学势相等出发，导出 2.1-13,14,15 等式与 2.1-21,22 等式。

对于实际蛋白质溶液中溶剂化学势公式，习惯上，将理想溶液化学势公式 $\mu_1 = \mu_1^{\ominus} + RT\ln x_1$ 加上一校正项 $RT\ln f_1$，其中 f_1 是以摩尔分数表示浓度的修正系数，通称活度系数。于是(2.1-16)式可写成

$$\mu_1 = \mu_1^{\ominus} + RT\ln x_1 + RT\ln f_1$$

$$\simeq \mu_1^{\ominus} - \frac{RT\widetilde{V}_1 c_2}{M_2} - RT(\alpha c_2^2 + \beta c_2^3 + \cdots) \qquad (6.2\text{-}1)$$

上式是按(2.1-16)式所得，此时溶质 2 的浓度极稀，$\ln f_1$ 因 f_1 小于一，可用 c_2 的负幂级数来表示。α、β 等是未知常数。(6.2-1)式又可写成

$$\mu_1 - \mu_1^{\ominus} = -RT\widetilde{V}_1\{\frac{c_2}{M_2} + Bc_2^2 + \cdots\}$$

$$= \frac{-RT\widetilde{V}_1 c_2}{M_2}\{1 + BM_2c_2 + \cdots\} \qquad (6.2\text{-}2)$$

式中 $1/M_2$——代表第一维里系数；

B ——代表第二维里系数；

… ——代表未写出的高维里系数项。

上式是著名的溶剂化学势维里展开公式，第二维里系数 B 作为非理想溶液度量的修正项。若溶质浓度极稀，即 $Bc_2^2 \to 0$，更高级维里系数展开项将更趋于零，(6.2-2)公式可简化为

$$\mu = \mu_1^{\ominus} - \frac{RT\widetilde{V}_1 c_2}{M_2} \qquad (2.1\text{-}16)$$

从二组元溶液中溶剂化学势公式推导所得的上述公式表明，在渗透压装置中，半透膜内侧由于溶质的加入，会使溶剂的化学势减

少。由此论点来看，(6.2-2)或(2.1-16)式中溶剂化学势的降低值$[-(\mu_1-\mu_1^{\ominus})]$，必等于渗透压与溶剂摩尔体积乘积($\pi\tilde{V}_1$)，以增加溶剂化学势来补偿。于是

$$\pi = RTc_2/M_2 + BRTc_2^2 + \cdots \qquad (6.2\text{-}3)$$

或在溶液极稀的情况下 $\pi = RTc_2/M_2$ (2.1-23)

重排(6.2-3)公式而得

$$\frac{\pi}{c_2} = RT/M_2 + BRTc_2 \qquad (6.2\text{-}4)$$

式中 R ——代表气体常数；

T ——代表绝对温度；

M——可代表蛋白质等大分子的相对分子质量；

c ——代表以克/升为单位的大分子浓度。

应用(6.2-4)公式，在恒温下测定每一浓度溶液的渗透压(见图 6-4)，以 π/c值对 c 作图，并将浓度外推到 0，即

$$\lim_{c\to 0}\frac{\pi}{c} = \frac{RT}{M_2} \qquad (6.2\text{-}5)$$

由 π/c 纵坐标上的截距可求得相对分子质量。一些渗透压法所求得的相对分子质量列于表 6-3。一般对于相对分子质量在10000～150000 范围的蛋白质，可用渗透压法测定其相对分子质量。

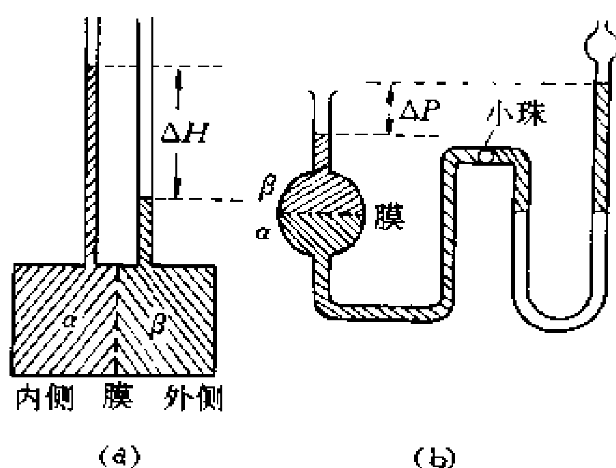


图 6-4 渗透压力装置

(a)静态型：利用液柱高差 ΔH 求流体静压力；

(b)动态型：自动调整液柱差至小珠不动。

假设溶质的相对分子质量并不均一，而是由几种相对分子质量不同的组元组成混合物，那末渗透压是各组元贡献的总和：

$$\pi = \sum_i \pi_i \tag{6.2-6}$$

$$\pi_i = RTc_i/M_i \tag{6.2-7}$$

于是

$$\pi = RT\sum_i c_i/M_i$$
$$= RT/[1/\sum_i c_i/M_i] \tag{6.2-8}$$

再用总溶质浓度$\sum_i c_i = c$同时乘以分子和分母得

$$\pi = RTc/[\sum_i c_i/\sum_i (c_i/M_i)] \tag{6.2-9}$$

现定义数均摩尔质量(以单位体积中重量表达浓度的公式)为

$$M_n = \sum_i c_i/\sum_i (c_i/M_i) \tag{6.2-10a}$$

如以单位体积中摩尔 n_i 或分子数 N_i 表达浓度的数均摩尔质量为

$$M_n = \sum_i n_iM_i/\sum_i n_i \tag{6.2-10b}$$
$$= \sum_i N_iM_i/\sum_i N_i \tag{6.2-10c}$$

因此

$$\pi = RTc/M_n \tag{2.1-23}$$

或

$$\pi/c = RT/M_n + \bar{B}c \tag{6.2-11}$$

式中 $\bar{B}$——代表平均维里系数。

(6.2-11)式表明,渗透压测定的相对分子质量实际上是非均一大分子溶质的数均摩尔质量。关于大分子的数均摩尔质量,可从溶液的任何一种依赖于单位体积中溶质分子数的依数性质(如渗透压、凝固点下降或沸点升高)的测定法中获得信息。

表 6-3 渗透压法获得的某些数均摩尔质量

物 质	M_n(数均摩尔质量)
卵白蛋白	44600
血红蛋白	66500
醛缩酶	156500
醛缩酶亚基	42400
直链淀粉(各种样品)	32000~150000

6.2.2 沉降作用与超速离心法

(一)沉降系数

超速离心技术的发展使生物学的研究进入了分子水平,这种仪器已常规地用于大分子物质的分离和提纯,并能测定它们的相对分子质量和分布的不均一性。暂时忽略溶液中无序分子间的相互作用之复杂情况,以最基本原理阐明超速旋转的离心装置中溶质分子的行为,它们是受到三种作用力形成的,即

(1)溶质分子受到一个离心力 F_c,它正比于离心装置旋转角速度(ω,单位 rad/s)的平方、溶质分子质量(m)与离旋转中心的距离(r)的乘积($F_c=\omega^2 rm$)(注:$\omega=2\pi n= v/r$, n 为圈数/s, v 为线速度);

(2)溶质分子置换了一些溶液而产生浮力,也等于应施于被置换的溶液质量(m_o)上的力($F_b=-\omega^2 rm_o$);

(3)上述力施加的结果,使溶质分子以速度(u)穿过溶液运动,将受到溶液的粘滞阻力引起的摩擦力($F_d=-fu$),f 是摩擦系数,于是溶质分子最终得到一总力平衡的稳定速度,即

$$F_c+F_b+F_d=0$$

$$\omega^2 rm-\omega^2 rm_o-fu=0 \tag{6.2-12}$$

溶液质量 m_o 可用溶质分子质量 m(克)乘以偏比容 $\bar{v}$(在等温等压下的大量系统中,保持其它组分量不变而只加入 1 克 i 溶质时所引起系统体积改变值),再乘以溶液密度(ρ)积($m_o=m\bar{v}\rho$)代替,所以

$$\omega^2 rm(1-\bar{v}\rho)-fu=0 \tag{6.2-13}$$

重排使实验可测得的数据列于等号一侧,而另一侧的分子质量 m 乘以阿佛加德数(L)化为相对分子质量可得

$$\frac{M(1-\bar{v}\rho)}{Lf}=\frac{u}{\omega^2 r}=S \tag{6.2-14}$$

式中 S——代表沉降系数,单位为秒,1×10^{-13}秒称 1 Svedberg,以大写 S 标记,是沉降速度 u 除以离心场强度($\omega^2 r$)的实

验测定值。

S 正比于相对分子质量乘浮力因子$(1-\bar{v}\rho)$,反比于摩擦系数(f)。

可设想原溶液中大分子溶质是均匀分布的,当施加超速离心力时,溶质大分子立即向背离旋转中心的方向运动而形成一个运动着的界面,于是可根据这个界面运动速度来计算沉降系数。以计算距旋转中心的半径 r_b 随时间的变化定义速度 u,即

$$u=\frac{dr_b}{dt}=r_b\omega^2S \tag{6.2-15}$$

积分式为 $\ln\frac{r_b(t)}{r_b(t_o)}=\omega^2S(t-t_o)$ (6.2-16)

式中 $r_b(t_o)$ ——代表 t_o 时界面位置;

$r_b(t)$ ——代表运动至 t 时的界面位置。

若以 $\ln[r_b(t)/r_b(t_o)]$对$(t-t_o)$作图,便可从斜率 ω^2S 中求出 S。

(二)扩散系数

从(6.2-14)式含有摩擦系数 f,可以看出一个大分子的沉降系数 S 受分子的形状和大小的影响,伸展的分子或成无规线团的分子,要比相对分子质量相同的紧密形态分子有着较大的 f 值。摩擦系数还因粘性而变化,所以对温度亦敏感。由于 RT/Lf = D(扩散系数),它受溶质浓度影响,于是 S 也会依赖于溶质浓度。在正常情况下,S 随浓度增加而减少。一般还务必在精确控制的稳定温度下实验。迅速的扩散可以造成在超速离心时不能清晰地分离出邻近的界面。扩散系数的求算常通过 Fick 第一扩散定律:

$$\frac{dn}{dt}=-DA\left(\frac{dc}{dx}\right)_t \tag{6.2-17}$$

可见在 dt 的时间内,通过已知面积 A 的物质量 dn 与该物质在系统中的浓度梯度$(dc/dx)_t$ 呈比例关系。研究扩散的方法是精心地用机械手段把溶剂铺在含待测溶质(例如蛋白质)的溶液上(或其它方法),形成一清晰的界面(即 t=0 时,此处作原点 x=0),溶质浓度在跨越界面时是突然从零到 c_o 值。分子的无规则布朗运动使溶质

向溶剂层逐渐渗透，因而界面变得模糊，最终完全混和。在研究扩散的实际实验操作中，使用的溶液柱十分长，所以可假设扩散过程在进行中，其顶部和底部（x= +∞和 -∞）的溶液浓度仍分别维持在零和 c_0（原始浓度）不变，见图 6-5 界面弥散的曲线。由此可导得公式的解为

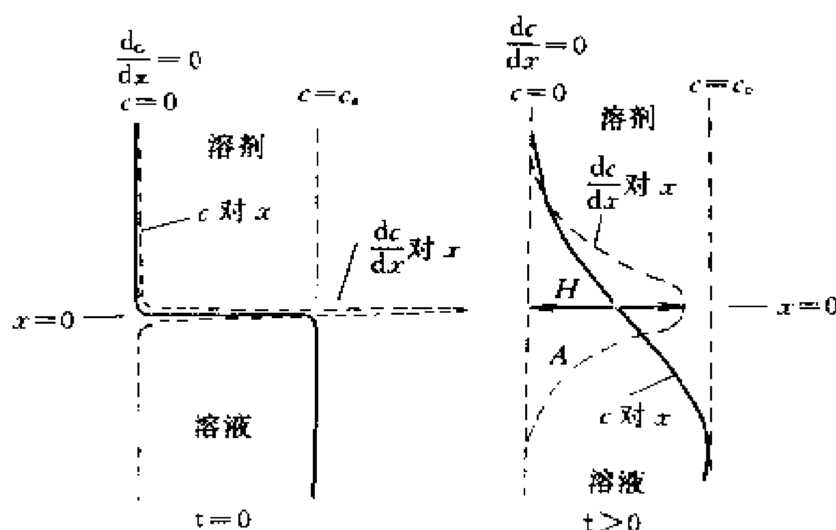


图 6-5　自由扩散中界面弥散过程

实线是 c 对 x 作图，虚线是 $\frac{dc}{dx}$ 对 x 作图，H 是 t 时弥散成钟形曲线的高度，其面积为 A

$$\left(\frac{\partial c}{\partial x}\right)_{x=0}=\frac{c_0}{2(\pi Dt)^{1/2}}=H \qquad (6.2\text{-}18)$$

式中　H ——代表钟形虚曲线的高度；

c_0 ——等于虚线下面积 A。

于是可得

$$C_0=\int_{-\infty}^{\infty}\left(\frac{\partial c}{\partial x}\right)dx = A \qquad (6.2\text{-}19)$$

$$(A/H)^2=4\pi Dt \qquad (6.2\text{-}20)$$

当扩散进行时，钟形曲线下的面积保持不变而高度却不断地减小。将 $(A/H)^2$ 对 t 作图，直线斜率为 $4\pi D$，所以通过对扩散现象的观察，可以算出扩散系数。

(三)相对分子质量的求算

若将 $Lf=RT/D$ 关系式代入(6.2-14)式,并以待测相对分子质量的溶质密度倒数($1/\rho_2$)代替偏比容 $\bar{v}$,便可得溶质的相对分子质量计算式:

$$M_2=\frac{RTS}{D[1-(\rho_1/\rho_2)]} \qquad (6.2\text{-}21)$$

以沉降系数 S 和扩散系数 D 算得相对分子质量的方法称作 S、D 法,由此计算所得的部分数据列于表 6-4。

表 6-4 一些蛋白质的相对分子质量

蛋白质	等电点(pI)	沉降系数(S)	扩散系数($D\times10^7$)	相对分子质量
牛心细胞色素 c	10.6	1.17	11.4	13370
马心肌红蛋白	7.0	2.04	11.3	16900
牛胰胰凝乳蛋白酶	—	2.54	9.5	23240
羊乳 β-乳球蛋白	—	2.9	7.5	37100
人血清白蛋白	4.8	4.6	6.1	68500
人血红蛋白	6.9	4.5	6.9	64500
马肝过氧化氢酶	5.6	11.3	4.1	247500
刀豆脲酶	5.1	18.6	3.46	482700
人血纤维蛋白原	5.5	7.6	1.98	339700
鳕鱼肌球蛋白	—	6.4	1.10	524800
烟草花叶病毒	—	198	0.46	40590000

测定相对分子质量也可采用沉降平衡法,该法是以适当超离心速度(低于沉降实验的速度)保持不变,而超离心沉降产生之向池底运动正好与扩散所产生的向上运动相互平衡时,便使蛋白质分子的分布趋于恒定。假定理想的二组元溶液中溶质达沉降平衡时所形成的浓度梯度,以池中液面(a)和某处(r)间浓度比的对数依赖于 r^2 的关系式为

$$\ln\frac{c(r)}{c(a)}=\frac{\omega^2M(1-\bar{v}\rho)(r^2-a^2)}{2RT} \qquad (6.2\text{-}22)$$

由 $\ln c(r)$ 对 r^2 作图,仅需要知道 $\bar{v}$、ρ、T 和 ω 等,便可求算相对分子质

量 M 。如果在理想溶液中的溶质不均一，每种相对分子质量的溶质组元 i 都可写出一个 r 与 a 处的浓度差方程，n 种组元的总和式即得

$$\sum_{i}^{n}[c_i(r)-c_i(a)]=\frac{\omega^2(1-\bar{v}\rho)}{RT}\frac{r^2-a^2}{2}\sum_{i}^{n}c_{oi}M_i \quad (6.2\text{-}23)$$

为了方便，假定各组元的偏比容都是相同的，即 $\bar{v}_i=\bar{v}$，那么 $[c_i(r)-c_i(a)]$ 便分别为沉降平衡时 r 处界面与 a 处液面的 i 组元浓度差，c_{oi} 为 i 组元在溶液中的原始浓度，M_i 是 i 组元相对分子质量，n 种组元溶质浓度之和代表溶质总浓度 $[c(r)-c(a)]$，于是

$$\frac{c(b)-c(a)}{c_o}=\frac{\omega^2(1-\bar{v}\rho)}{RT}\frac{b^2-a^2}{2}\frac{\sum_{c=1}^{n}c_{oi}M_i}{\sum_{i=1}^{n}c_{oi}} \quad (6.2\text{-}24)$$

式中的 $c_{oi}M_i/\sum c_{oi}$ 由于 c_{oi} 是以单位体积中克数为浓度，而被称作质均相对分子质量 M_w。表明公式可在确定平衡时溶液柱两端（r 处应用扇形池底部 b 处代入）间浓度差被原始浓度除后即可测出质均相对分子质量 M_w。由同样数据可获得 Z 均相对分子质量 M_Z，即

$$M_Z=\sum c_{oi}M_i^2/\sum c_{oi}M_i$$

某些物质通过沉降平衡测定的结果见表 6-5。

表 6-5　沉降平衡法获得的某些相对分子质量

物　质	自化学式算得的相对分子质量	沉降平衡法获得的相对分子质量
蔗糖	342.3	341.5
核糖核酸酶	13683	13740
溶菌酶	14305	14500
胰凝乳蛋白酶原	25767	25670
30S 大肠杆菌核糖体	—	900000

对于非均一相对分子质量的溶质在沉降平衡实验中之情况是较复杂的，溶质各组元 i 会发生重新分布，液面上的表观相对分子质量随时间而减小，而池底的表观相对分子质量将增加，这是由于相对分

子质量较大的溶质会被选择性地从液面下沉而积集到池底所致。如果利用某种物质(例如蔗糖或甘油)造成一线性浓度梯度,然后加入大分子溶液进行超速离心沉降,这种方法称密度梯度超速离心沉降法。该法的分离分辨力很好,它有两种操作技术:

(1)在开动超速离心机达沉降平衡之前,先造成某物质的浓度梯度(使离心管底部密度最大),再将大分子组元加入此梯度顶部,超速离心达平衡;

(2)先将某物质密度渐减的溶液细心地铺层而造成一密度梯度,并将此溶液顶部某物质还稀的大分子溶液铺在此梯度溶液上面,随后研究大分子物质通过该梯度的沉降过程。

当离心管旋转适当长时间后,大分子即按其相对分子质量大小形成的各组分分层。存在某物质密度梯度的特点是使溶液在离心中断的一定时间内较稳定,不会马上引起大分子分层分布受到搅混,最后通过在离心管底部的孔,分别细心地放出分层的各个组分,收集在不同试管内,于是密度梯度超速离心沉降法不仅能测定沉降系数,从而计算相对分子质量,还可用于制备性分离。

(四)界面测定技术

定量地研究扩散、沉降和电泳等界面移动信息,需要一种能跟踪报告界面的形状和位置的变化数据而不会干扰系统的技术。最广泛使用的方法几乎总是以光学为基础。

(1)吸收光学系统

此法是利用物质会吸收光的特定波段,且与浓度有关,由此便可确定一溶质在样品池中不同位置的浓度。在绝大多数情况下是使用紫外光。如果光源是单色的,使用对应于物质特定的吸收带光,便能独立地测定两种或两种以上溶质的浓度及其形成的边界。通常,其装置如图 6-6 所示。

照相底板上聚焦成池子像,在不同高度上的黑度取决于对应高度上能通过的光量。用光密度计扫描照相底板便能测量黑度,突变处即是沉降中的界面。但是底板的黑度是随曝光时间、显影和底部

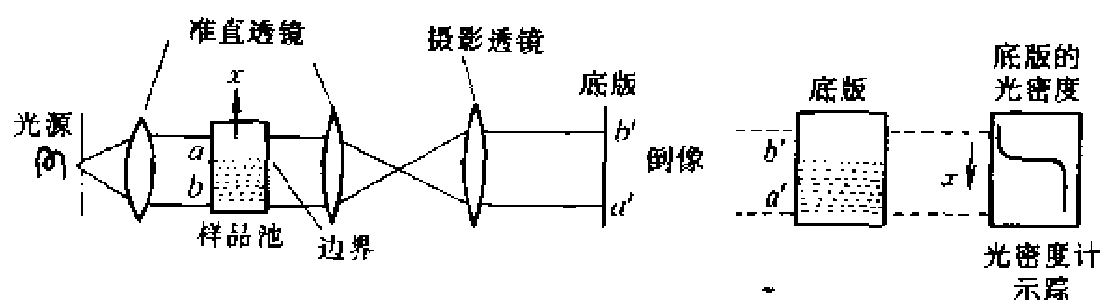


图 6-6　吸收光学系统，照相法和光密度计示踪

特性以及溶液的光密度改变而变化。

(2)暗线照相光学系统

在研究沉降速度时最广泛应用的方法是暗线照相光学系统。基本原理是平行光通过一个具有折光率梯度的装溶液池子即产生偏转，绝大部分偏转发生在梯度最陡的部位(即界面区偏转角最大)，参见图 6-7。圆柱形透镜将有斜形细长孔的聚焦平面 P 上所形成的狭缝像聚焦在底板 z 方向上(仅 z 向折散)，其程度正比于池中折光率梯度，在 P 上斜形狭缝的各种 θ 角时可产生各暗线照相像。

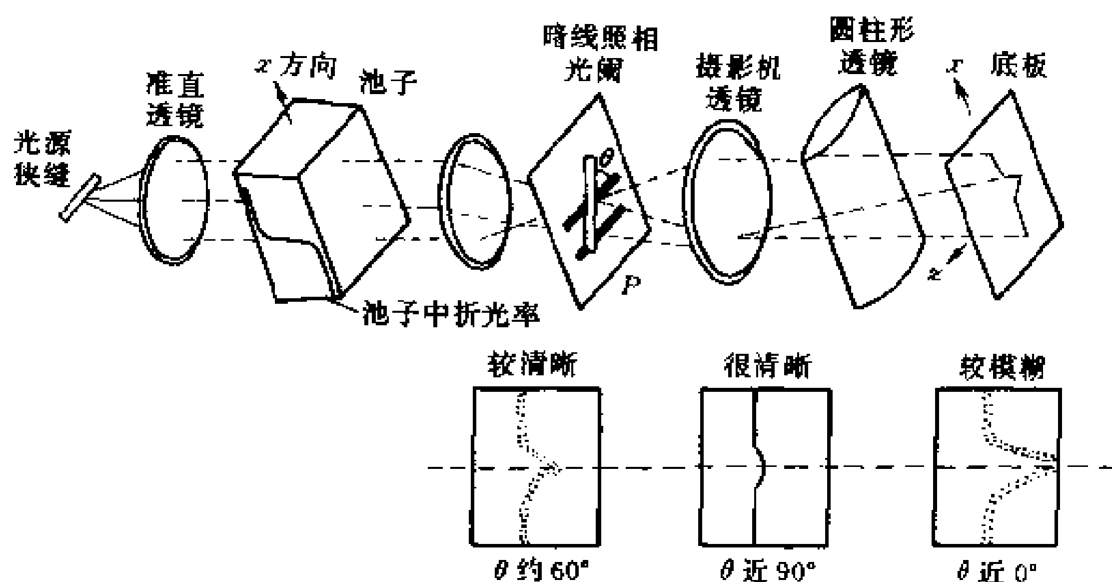


图 6-7　圆柱形透镜暗线照相系统

暗线照相系统中斜形狭缝斜放的作用是使由于折射率而偏离最远的光线能通过它，圆柱形透镜又把平面 P 上侧偏的偏振光聚焦在底板上，最终侧向偏转的光在底板上描绘的侧向偏转图形依赖于池中溶液折光率梯度和狭缝斜放的 θ 角度（常用一金属细丝代替斜狭缝，以获得亮背景上产生一条黑线）。因此，暗线照相系统可广泛地用于检验界面形状，但当池中溶液浓度小于每毫升数毫克时未能获得精确的信息。

(3)干涉量度光学系统

该系统装置类似于暗线照相系统，图 6-8 所示的瑞利干涉仪最常用，不过它的光源狭缝转 90 度，与池轴平行放置，并使用两个池，一个放溶剂作参考液，另一个池有溶液-溶剂界面，光线分别经两池前狭缝（一般是一对狭缝），会产生复杂的双狭缝干涉图形。

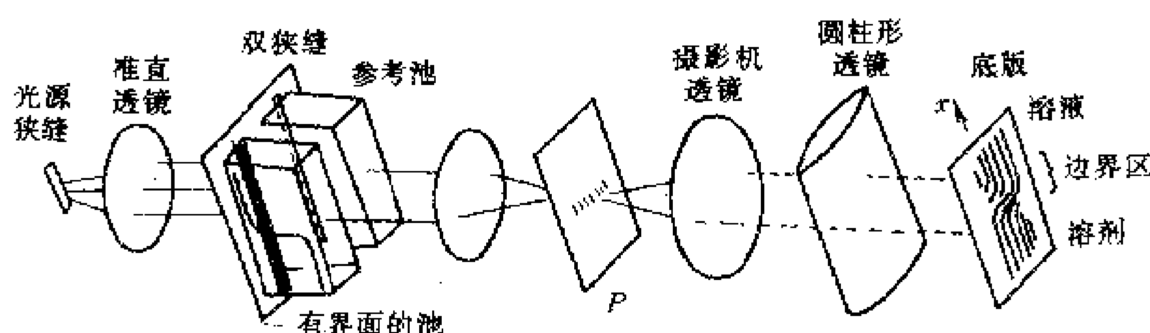


图 6-8　瑞利干涉系统简图

由于光的波动偏移和一对池子在不同高度上产生的光程差不同，因此池中的每一层都产生各自的干涉图形，并都在聚焦平面 P 上叠加，形成瑞利条纹，每条条纹描绘着折光率与距离的关系，从干涉图形可以确定边界。

6.3　粘度法信息

上述讨论的扩散、电泳迁移率和沉降的测试提供了许多有关溶

液中大分子的大小、形状和大体构象的信息。为进一步了解更多大分子在溶液中的形态，常在研究中进行了粘度测试。

6.3.1 粘度的基本知识

粘滞性是一切流体所共同具有的一种物理性质，它会引起流体流动时产生阻力，该阻力可由粘度来度量。可见粘度是度量流体在流动中的阻力。根据流体力学考察，在两块很大(假定是无限的)的平行板间夹着一种液体，底部一块板是静止的，如施加应变切力将 y 轴上面的另一块板，以恒速 v 向 x 方向推动(参见傅献彩等所编《物理化学》)。该板所接触的无限薄液层因表面作用而随板应变，中间各液层因下层对上层流动发生阻力而以不同程度彼此滑动，则引起了层流，于是液体受到形变，这种形变称为切变。倘若纯液体中掺入分散物(如大分子)，层流就会发生变化，虽然分散物粒子受到流体的力朝同一方向以一定速度移动，但流体的运动速度遭到粒子的阻拦而减慢，表现出该流体的粘度增加。

任一点切应变定义为 dx/dy，而切变应力(σ)定义为在 x 方向上推动顶板的力(F)除以与流体接触的板面积(A)，假定同一流层中微粒间不相互作用，分散质微粒的大小和形状不会因流体的层流而发生变化，这种牛顿流(Newtonian flow)的液体切变应力与切应变率间的关系可简单表达为

$$\sigma=\frac{F}{A}=\eta\frac{d}{dt}\left(\frac{dx}{dy}\right) \tag{6.3-1}$$

或

$$\sigma=\eta\frac{d}{dy}\left(\frac{dx}{dt}\right)=\eta\left(\frac{du_x}{dy}\right) \tag{6.3-2}$$

式中 η——代表粘滞系数。

η 表示液体的粘度，它等于 A = 1 和 $\frac{du_x}{dy}=1$ 时所必须施加的推动力，单位常以泊(poise)表示，1 泊即为 1 克·厘米$^{-1}$·秒$^{-1}$，若换为 SI 制，1 泊 = 10^{-1}千克·米$^{-1}$秒$^{-1}$。

爱因斯坦首先指出，粘度的另一种含意是流体中耗散率的度量。

如将切应变率$\frac{du_x}{dy}$乘以式(6.3-1)的两边,则得

$$\frac{Fdu_x}{Ady}=\eta(\frac{du_x}{dy})^2 \tag{6.3-3}$$

式中　Fdu_x——代表在 dt 内花费于液体切应变率上的能量,或使流体变形所作的功($\frac{Fdx}{dt}$);

Ady——代表流体的无限薄层体积。

可见,(6.3-3)式等号左边代表流体单位体积能量的耗散率,即

$$\frac{dE}{dt}=\eta(\frac{du_x}{dy})^2 \tag{6.3-4}$$

A.Einstein 导出了粘滞度定律:

$$\frac{\eta}{\eta_0}=1+\nu\phi+\kappa\phi^2+\cdots \tag{6.3-5}$$

式中　η_0、η——分别代表溶剂的粘度和分散体系的实测粘度;

ν、κ——分别代表一次项和二次项的爱因斯坦因子;

ϕ——代表球形胶粒所占溶液总体积的分数。

已经证明刚性球形微粒的 $\nu=2.5$,对于长圆形(蛋型)和扁圆形(铁饼型),因子 ν 是它们的轴比之函数。

在极稀溶液中的 ϕ 值很小,且可能存在的溶质粒子间的相互作用影响也极小,二次项以上的高次项都可略去。于是

$$\frac{\eta}{\eta_0}=1+\nu\phi \tag{6.3-6}$$

实验的数据验证,溶液浓度条件要求<10 体积%,(6.3-6)公式是正确的,否则便会产生偏差,此时需要保留较高次项。

当 ϕ 以每毫升克数的溶质浓度乘以偏比体积 $\bar{v}$ 代替时,(6.3-5)式可写成:

$$\frac{\eta}{\eta_0}=1+\nu\bar{v}c+\kappa\bar{v}^2c^2+\cdots \tag{6.3-7}$$

粘滞定律表明,溶液粘度与溶质浓度、偏比体积和 ν 因子轴比函数所

描绘的形态等有关。由此可获得它们的一些信息。

6.3.2　各种粘度表示法与相对分子质量有关公式

当大分子化合物加入纯溶剂后，形成的稀溶液粘度(η)总是比纯溶剂的粘度(η_0)增高，常以相对粘度 η_r 来表达 η/η_0 之比，于是(6.3-7)表示为

$$\eta_r = 1 + \nu\bar{v}c + \kappa\bar{v}^2c^2 + \cdots \qquad (6.3\text{-}8)$$

如果将溶液对溶剂的粘度增量($\eta - \eta_0$)除以 η_0，即可用增比粘度 η_{sp} 来表示，则

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \eta_r - 1 = \nu\bar{v}c + \kappa\bar{v}^2c^2 + \cdots \qquad (6.3\text{-}9)$$

或者用增比粘度 η_{sp} 与浓度 c 之比来表达比浓粘度(η_{sp}/c)，则(6.3-9)式变为

$$\eta_{sp}/c = \nu\bar{v} + \kappa\bar{v}^2c + \cdots \qquad (6.3\text{-}10)$$

当 $c\to 0$ 时，η_{sp}/c 的极限值称为特性粘度(或固有粘度)，若以[η]符号表示，由(6.3-10)式便可得到

$$[\eta] = \nu\bar{v} \qquad (6.3\text{-}11)$$

于是

$$\eta_{sp}/c = [\eta] + \kappa\bar{v}^2c = [\eta] + k'[\eta]^2c \qquad (6.3\text{-}12)$$

在极稀的溶液情况下，高次项可略去，不会产生大的偏差。该式表明了比浓粘度与溶质的特性粘度以及溶质浓度的关系。当溶质在各种浓度时，通过测定其溶液的粘度，并外推到 η_{sp}/c 为零(无限稀释的情况)，便可在 η_{sp}/c 对 c 作图的延长线与纵坐标轴的截距上获得[η]值。[η]的单位是每克毫升。特性粘度[η]是几种粘度表示法中最能反映溶质分子本性的一种物理量。

通过相对粘度的自然对数与浓度之比，也可得到另一个与特性粘度有关的公式。因为

$$\frac{\ln\eta_r}{c} = \frac{\ln(1+\eta_{sp})}{c} = \frac{\eta_{sp}}{c}\left(1 - \frac{1}{2}\eta_{sp} + \frac{1}{3}\eta_{sp}^2 + \cdots\right) \qquad (6.3\text{-}13)$$

当 $c\to 0$ 时，η_{sp} 的高次项也趋于零，所以

$$\lim_{c\to 0}\frac{\ln\eta_r}{c}=\lim_{c\to 0}\frac{\eta_{sp}}{c}=[\eta] \tag{6.3-14}$$

在此也可以得到，相对粘度的自然对数与浓度 c 之比和溶质特性粘度$[\eta]$以及溶质浓度的经验关系式：

$$\frac{\ln\eta_r}{c}=[\eta]-\beta[\eta]^2c \tag{6.3-15}$$

从$\frac{\ln\eta_r}{c}$对 c 作图也可得一直线，外推至 $c\to 0$ 的纵坐标上之截距，也能求得$[\eta]$值。

上述(6.3-12)和(6.3-15)两式的直线，外推至 $c\to 0$ 时，应交于纵坐标的同一点上。这便可获得较为准确的$[\eta]$值。

1953 年 Staudinger 提出了含两个参数(κ,α)的方程，以联系特性粘度$[\eta]$与大分子相对分子质量的关系式，即

$$[\eta]=\kappa M^{\alpha} \tag{6.3-16}$$

参数 κ 的单位与$[\eta]$相同。对于大分子链可自由舒展的体系 $\alpha=1$(有的是在 1 以上)，对于乱绕成线团的大分子体系 $\alpha=\frac{1}{2}$，说明 α 是一与分子形态有关的数值。它们是大分子与溶剂分子相互作用的信息，与其溶剂、大分子本性、浓度和温度等紧密相关，而与相对分子质量近似无关的参数，可由实验测得。

(6.3-16)公式可用于测定大分子的相对分子质量，不过，必须使用标准样品预先测得$[\eta]$，从而求出 κ 和 α 值。

6.3.3 粘均相对分子质量的测定

毛细管粘度计是测量溶液和溶剂粘度可达精度非常高的仪器，其中最常用而又简单的是奥氏(Ostwald)粘度计。当液体在毛细管粘度计内因重力作用而流出一定体积所需要的时间是遵守泊肃叶(Poiseuille)定律的，其公式为

$$\eta=\frac{\pi r^4 thg\rho}{8lV} \tag{6.3-17}$$

式中　V——代表流经毛细管的液体体积；

r ——代表毛细管半径；

ρ ——代表液体密度；

l ——代表毛细管的长度；

t ——代表液体流下一定体积所需的时间；

h ——代表作用于毛细管内液体上的平均液柱高度；

g ——代表重力加速度。

对于同一支粘度计而言，h、r、l、V 是恒定的常数，则(6.3-17)式可改写为

$$\eta = K\rho t \tag{6.3-18}$$

在稀的大分子溶液下进行粘度测定，溶液的密度 ρ 与纯溶剂的 ρ_o 可近似相同，则溶液的相对粘度为

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_o} = \frac{K\rho t}{K\rho_o t_o} = \frac{t}{t_o} \tag{6.3-19}$$

根据(6.3-19)式，用同一毛细管粘度计，分别测定同量的纯溶剂和溶液流出相同体积 V(奥氏粘度计标记的上线至下线的体积)所需的时间 t_o 和 t，计算出 η_r 和 η_{sp}，然后分别以 η_{sp}/c 对 c 和 $\ln\eta_r/c$ 对 c 作图，外推至 $c \to 0$ 时同交纵坐标于一点，从该截距即得$[\eta]$，于是使用(6.3-16)式求得相对分子质量。

对于具有一定相对分子质量分布的大分子，由粘度法所求出的相对分子质量称作粘均相对分子质量($\overline{M}_\eta$)。一般，$\overline{M}_\eta$ 数值在数均相对分子质量和质均相对分子质量之间。由于

$$\lim_{c\to 0}\eta_{sp} = Kc\overline{M}_\eta^\alpha = K\sum c_i M_\eta^\alpha = Kc\frac{\sum c_i M_{\eta_i}^\alpha}{c}$$

即

$$\overline{M}_{\eta}^{\alpha} = \frac{\sum c_i M_{\eta_i}^\alpha}{c} = \frac{\sum c_i M_{\eta_i}^\alpha}{\sum c_i} = \frac{\sum n_i M_{\eta_i}^{\alpha+1}}{\sum n_i M_{\eta_i}}$$

$$\overline{M}_\eta = \left[\frac{\sum n_i M_{\eta_i}^{\alpha+1}}{\sum n_i M_{\eta_i}}\right]^{1/2} \tag{6.3-20}$$

式中 n_i ——代表按相对分子质量大小分级所得 i 级分的量，摩

尔；

M_{η_i} ——代表 i 级分的粘均相对分子质量。

测定相对分子质量的粘度法对温度非常敏感，这就需要严格控制恒温度。

乌氏粘度计是在毛细管下部加一放空泡并与其相连接的旁支管，当液体自储球经放空泡、毛细管、计量泡抽至缓冲泡后，让连接放空泡的旁支管接通大气，使放空泡中的液体回流而落入储泡，致使液柱高度恒定，避免液柱造成误差。所以乌氏粘度计是在奥氏粘度计基础上所作的改进。

6.4 吸收光谱和辐射的发射

辐射是一种在时间和空间上作正弦振荡的电磁场，它能以一定能量的光子微粒与其它物质相互作用，或被物质吸收或又转以一些波长进行发射。

6.4.1 吸收光谱的一般知识

通常，分子处于一定的能级上，以一简单的双原子分子为例，它的能量首先取决于电子状态，即电子在分子中占有的某一套组态轨道，对某一给定的组态，能量还依赖于核间距离，如图 6-9 所示，每一个电子组态，分子具有一组许可的振动能级〔图 6-9(A)的水平线上示意〕。还有转动能量也是量子化的〔图 6-9(A)中以短线画出少许在两个振动能级间的转动能级〕，相当于群集在每个振动能上间距更密集的谱线组。用简单之例，可使人们容易理解吸收光谱的最重要特征。分子的能级跃

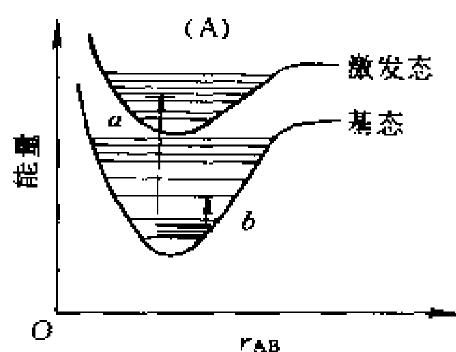


图 6-9(A) 双原子分子的能级曲线表示两个电子组态的分子位能是核间距的函数，每个电子组态还有分子的振动和转动能级

迁可能发生在电子能级、振动能级或转动能级之间,随之需要吸收相应的能量[图 6-9(B)],即选择吸收一定能量的光子,使分子能量发生相应许可的变化而引起能级跃迁。生物化学感兴趣的物质很少观察到它们的纯转动光谱。

光子的能量是以 $E=h\nu$ 表达。式中 h 是普朗克常数(6.626×10^{-34}焦耳·秒),辐射频率 ν 可示出辐射的能量,频率是以光速 c 除以波长 λ,即 $\nu=\frac{c}{\lambda}$,单位为秒$^{-1}$。于是波长 λ 也可反映出辐射的能量,λ 的常用单位为埃($\mathring{A}=10^{-8}$厘米)、微米($\mu=10^{-6}$米)、毫微米($m\mu=10^{-9}$米)或纳米($nm=10^{-9}$米),有时采用波数 $\bar{\nu}(=\frac{1}{\lambda})$代替,通用单位是(厘米)$^{-1}$。

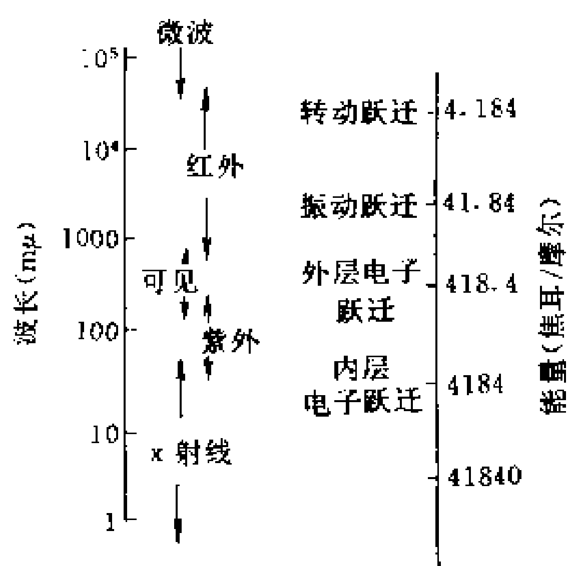


图 6-9(B) 电磁波能量与跃迁对应图

借助光谱学来研究生物物质的结构及其功能,除了利用某些物质在接受光子能量而发射的荧光或磷光之外,通常都是利用它们的吸收光谱来推定其具有的基团,并结合基团的化学反应等现象来研究它们的功能。往往为了维持生物分子的整体性和活性,就在溶液中进行吸收光谱分析。在稀溶液情况下,光的吸收过程可以服从 Beer-Lambert 定律,即

$$I=I_o\times10^{-\varepsilon cd}$$

式中 I_o——代表入射光的强度;

I ——代表透过一个厚为 d 厘米内含溶液浓度 C 的比色池后的光强度;

ε ——代表消光系数。

ε是被测分子的一个特性常数，单位随 c 的单位而定，若 c 的单位为摩尔/升，它则是升·厘米$^{-1}$·摩尔$^{-1}$；当 c 的单位用克/100ml 时，它即是毫升·厘米$^{-1}$·克$^{-1}$的百分率。分光光度计通常可直接记录 $I/I_0 \times 100$ 的百分透过率(T%)或吸光度 $A = \log(I_0/I)$，透光度 T 的负对数与溶液的浓度成正比，即

$$A = -\log T = \varepsilon cd \qquad (6.4.1)$$

由 A 可直接获得浓度信息。

吸收光谱的分析需要已知波长的单色光，光源常用氙弧灯，发射范围宽广的辐射，经一棱镜或光栅单色仪可连续调节按序(自动扫描)选出所需波长的光束，通过分光仪分裂成两部分光束，分别透过样品池和对照池(一般只盛溶剂)，用光电倍增管测量透过光强度，同步记录了作为波长 λ 函数的吸光度 A。

6.4.2 红外吸收光谱

当一定频率的红外辐射分子而遇振动频率相同的基团时，便会发生共振，光能通过偶极矩的变化而传递给分子，也只有偶极矩变化的振动才能产生共振吸收，此时这基团就吸收了该一定频率的红外光，分子也由原来的基态振动能级跃迁到较高的激发态振动能级。如果红外光的振动频率和分子中各基团的振动频率都不相同，红外光就不被吸收。

现以亚甲基($—CH_2—$)为例，图 6-10 表示基团的二大类振动形式，即伸缩振动(对称伸缩振动与不对称伸缩振动)和变形振动，变形振动又可分为面内变形振动(剪式摆动与面内摆动)和面外变形振动(面上上下下摆动与面上下扭曲摆动)。其它一些基团的吸收频率区域列于表 6-6 作参考。

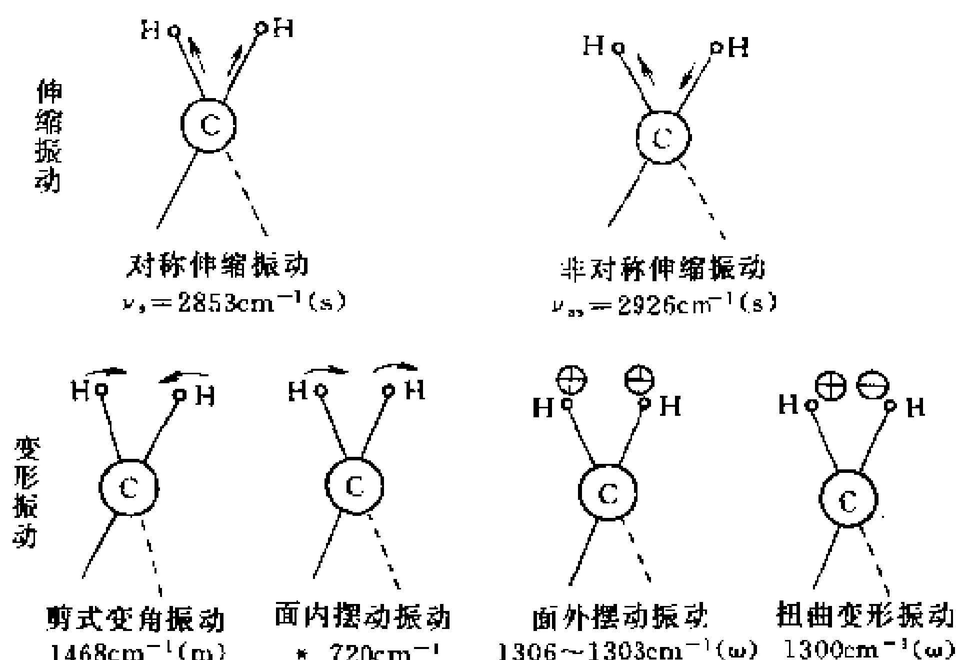


图 6-10 亚甲基的各种基本振动形式

箭头表示纸面上振动； ν_s 表示对称伸缩振动频率； ⊕和⊖表示垂直纸面上下振动； ν_{as}表示不对称伸缩振动频率； * $\leftarrow CH_2 \rightarrow_n$ 当 $n>4$ 时,才会出现 $720cm^{-1}$ 吸收峰。括号中 s 表示强吸收;m 表示中强吸收;ω 表示弱吸收。

表 6-6 一些基团的红外吸收区域参考值

区域	基 团	吸收波数(cm^{-1})	振动形式	吸收程度
第一区域	—OH(游离)	3730～3500	伸缩振动	中等,* 峰
	—OH(缔合)	3520～3100	伸缩振动	强,宽带
	$—NH_2$,—NH(游离)	3550～3420	伸缩振动	中等
	$—NH_2$,—NH(缔合)	3500～3100	伸缩振动	强,宽带
	≡CH	3310～3200	伸缩振动	强
	$=CH_2$	3090～3070	伸缩振动	强
	＞CH	3020±10	伸缩振动	强
	$—CH_3$	2960±15	不对称伸缩振动	强
	$—CH_3$	2870±15	对称伸缩振动	强
	＞CH_2	2926±5	不对称伸缩振动	强
		2850±5	对称伸缩振动	强

续 表

区域	基　　团	吸收波数(cm^{-1})	振动形式	吸收程度
第二区域	$C\equiv N$	2400～2100	伸缩振动	强,针峰
	$N\equiv N$	2310～2135	伸缩振动	中等
	$C\equiv C$	2250～2150	伸缩振动	强度可变
	$C=C=C$	1950 附近	伸缩振动	强度可变
	$C=C$	1690～1600	伸缩振动	中等,弱
	芳环中 $C=C$	1600、1580 1500、1450	伸缩振动	强度可变
	$C=O$	1900～1550	伸缩振动	强
	$-NO_2$	1600～1500	不对称伸缩振动	强
	$-NO_2$	1300～1250	对称伸缩振动	强
	$S=O$	1200～1040	伸缩振动	强
	$-NH_2$	1650～1560	变角振动	强
	$-CH_3$ $=CH_2$	1380 附近 1460±10	对称变角振动 变角振动	中等
	C—O(羧基中)	1300～1000	伸缩振动	强
	C—O—C	1150～1070	伸缩振动	强
	C—F	1400～1000	伸缩振动	强
	—OH(羧基上)	950～900	面外变形振动	—
	$=CH_2$	910～890	面外摇摆	强
	C—Cl	800～600	伸缩振动	强
	C—Br	600～500	伸缩振动	强
	C—I	500～200	伸缩振动	强
	$\leftarrow CH_2 \rightarrow_n$　n>4	720	面内摇摆	强度可变

基团红外吸收光谱的特征频率是与分子结构(或构型)密切相关。例如,基团 C=O 在酯类分子中的特征频率(以波数 $\bar{\nu}$ 表达)为 1760～1720;在醛类中 $\bar{\nu}$=1725～1715;在酮类中 $\bar{\nu}$ 为 1720～1705;在羧中 $\bar{\nu}$=1700cm^{-1}左右;在脲基中 $\bar{\nu}$=1720～1670;在酰胺类中 $\bar{\nu}$=

1690～1620。烯烃的面外变形振动在反式构型 $\begin{matrix} R & & H \\ & C=C & \\ H & & R \end{matrix}$ 中 $\bar{\nu}$=990～970，而顺式构型 $\begin{matrix} H & & H \\ & C=C & \\ R & & R \end{matrix}$ 中在 $690cm^{-1}$ 附近。分子基团的特征频率之位置和形状还受到分子环境的影响，可以向低波数或高波数位移，甚至谱峰变宽。

人们研究的生物化学物质，大部分是在溶液中的大分子，它们的吸收光谱常具有复杂性而使人难于解析，然而分子中有些基团在振动跃迁上呈现出特征频率，可以帮助人们摆脱困境。通过可识辨的这些红外光谱带，能获得分子结构方面的信息。例如，许多分子内—C＝0 基团具有约 $1700cm^{-1}$ 的伸缩振动吸收峰，—NH 基团有 $3400cm^{-1}$ 左右的伸缩振动吸收峰。

应用红外光谱分析生物物质时常会遇到严重的干扰，这是由于水分子所引起的极强烈吸收光谱带使位于约 3400 和 $1600cm^{-1}$ 区域处的吸收峰变得大而宽，以致在水溶液中无法进行研究。使用物质的无水分子之干膜进行研究，或者以 D_2O 为溶剂配制溶液可使溶剂的吸收区移至不太令人感兴趣的 1200 和 $2500cm^{-1}$ 附近的区域，这样便可在一定程度上避免了上述的干扰。

6.4.3 可见与紫外吸收光谱

能量较低的外层价电子跃迁通常产生的分子吸收光谱在可见光频率区域。含某些金属离子（特别是过渡元素）的生物化合物，例如正铁血红素蛋白质在可见光区域中有强烈而宽的电子跃迁吸收带，这主要是由于具有共轭双键的正铁血红素基团引起的。还有含大的芳香族结构和共轭双键系统，例如维生素 A 的共轭双键结构。

在近紫外（波长为 200～400 毫微米）光谱区域，许多生物物质呈现出强烈的吸收谱带，这些常是由于小的芳香族和杂环族的共轭环形 π 电子相互作用所引起的。例如苯基丙氨酸、酪氨酸和色氨酸等

芳香族氨基酸在此区域中呈现强烈的吸收(见图 6-11)。蛋白质在 280 毫微米区域中的吸收大多数都是由于这些残基的存在,近紫外

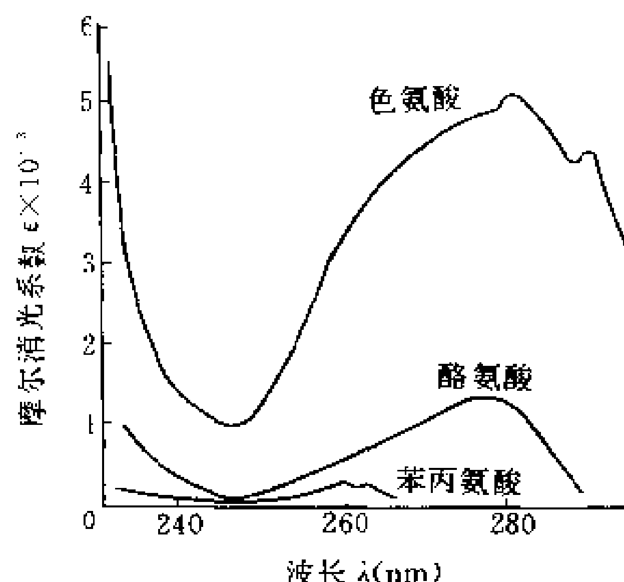


图 6-11 pH=8 时色氨酸、酪氨酸和苯基丙氨酸的紫外吸收光谱

吸收的性质仅由这些芳香族氨基酸含量所决定。所有嘌呤和嘧啶碱也是在近紫外区域中有强吸收,这一些吸收带大致上都对应于芳香环中 π 电子跃迁至反键 π* 轨道(π→π* 跃迁)引起的。在约 200mμ 处的强吸收带是肽骨架本身的电子位移的跃迁,它还伴有一 225mμ 处较弱的吸收带。在 180mμ 以下,由于空气中 O_2 的吸收,还有水分子或所有溶剂引起的吸收等的干扰,是极难分析的区域,干燥、真空是排除干扰的唯一办法。通常紫外光谱只分析出波长在 200mμ 以上的吸收带,例如,pH = 6 时苯基丙氨酸最长的波长吸收带在 257mμ(ε=200 升·厘米$^{-1}$·摩尔$^{-1}$);酪氨酸为 275mμ(ε= 1300 升·厘米$^{-1}$·摩尔$^{-1}$)和色氨酸为 280mμ(ε= 5000 升·厘米$^{-1}$·摩尔$^{-1}$)。pH=7 时 5′-磷酸腺嘌呤的最长波长吸收带在 259mμ(ε= 15000 升·厘米$^{-1}$·摩尔$^{-1}$);5′-磷酸胞嘧啶在 271mμ(ε=9000 升·厘米$^{-1}$·摩尔$^{-1}$);5′-磷酸尿嘌呤在 262mμ(ε= 10000 升·厘米$^{-1}$·摩尔$^{-1}$);5′-磷酸乌嘌呤在 252mμ 处(ε= 14000 升·厘米$^{-1}$·摩尔$^{-1}$)。以上各化合物在 200mμ 附近处还有其它强吸收带,对此,一般的紫外光谱分

析仪是很难扫描获得。

6.4.4 荧光和磷光

分子吸收光能而从基态激发到较高能级上之后，通常能量是以热的形式在不引人关注下传递到环境中(引起熵值增加)，不过在有些情况下，吸收光能的分子能再辐射，辐射光频率与吸收的激励光频率不同，这类分子发射光称为荧光。图 6-12 简介了一种物质呈现荧光的基本原理，在大多数情况下光子被分子吸收后，首先产生的往往是激发电子态中较高的振动态。

在有机化合物中吸收光子后，最常出现的分子基态到激发态的电子跃迁有：非键轨道(n)上的一个电子跳跃至反键的 π^* 轨道，即 $n\rightarrow\pi^*$ 跃迁，如甲醛的羰基上电子跃迁；$\pi\rightarrow\pi^*$ 跃迁，如烯烃中的电子跃迁；$n\rightarrow\sigma^*$ (反键的 σ 轨道)跃迁和 $\sigma\rightarrow\sigma^*$ 等。

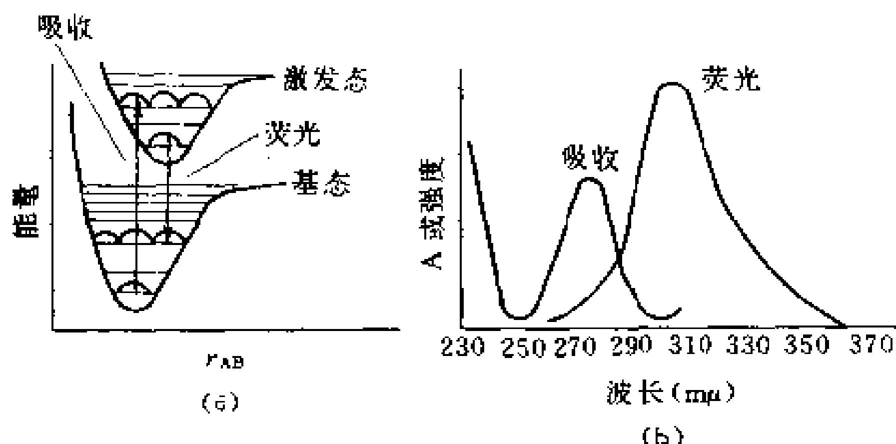


图 6-12

(a)成键电子吸收光子，产生荧光；(b)酪氨酸的荧光发射光谱与其吸收光谱

在电子激发态中有两个不配对电子，它们分别占据不同的轨道，如果这两个电子的自旋平行，自旋相同的电子相互作用会彼此排斥，这种电子激发态通常称作三线态，以 T 表示；当这两个电子处于自旋不同的反平行状态时，称之为单线态，以 S 表示。同样的电子激发而处于三线态的能量通常是低于单线态的。有机化学中遇到的分子基态几乎都是单线态(全部电子均是反平行配对)，即使吸收光子而形成激发态也差不多总是单线态的。

激发状态的转变可用一简图来描写(图 6-13)。如果某分子的基态(S_0)吸收一个光子导致激发单线态(S_1 或 S_2)的形成(实线箭头)。此激发单线态可以有多种类型的途径来实现其转变,可能以自旋允许的内部转变(无辐射衰变以~~~~→表示)和辐射荧光(即自旋允许的辐射衰变以……→表示)回复到基态 S_0,也可能以系间窜跃(自旋禁阻,以 ⌇⌇⌇→ 表示)或辐射磷光(以—·—·—→表示,自旋禁阻)等途径回复到 S_0。激发状态的变化还有化学反应和能量传递耗散的其它途径。

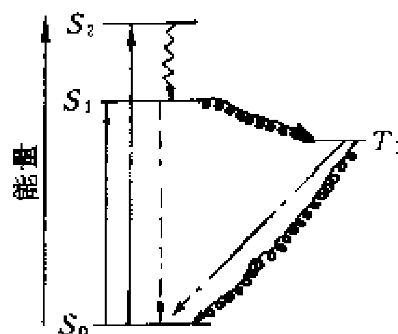


图 6-13　体系状态转变简介

由于带电荷的电子在旋转时产生了磁矩,与电子在轨道中运动所产生的磁场相耦合(自旋——轨道耦合),致使自旋禁阻的单线态→三线态系间窜跃有可能发生。

实际上,分子激发态丧失过量振动能所需的松弛时间(约 10^{-12} 秒)比电子激发态的寿命(约 10^{-9}秒)要短得多,因此激发态的分子于再发射之前有充分的松弛时间来使能量耗散而降到最低的振动能级。于是就有两种情况:(1)全部激发能均由于松弛(例如振动弛豫)而耗散,并以无辐射方式丧失;(2)可能以热的形式耗散部分激发能,使分子降到激发态的最低振动能级,然后再辐射频率低于激发光的荧光,由降到基态的各个振动能级的相对概率取决于荧光谱形。荧光光谱也能作为一种化合物(或发色团)的特征指印而用于分析鉴定。

如果使用偏振光,光的偏振方向与跃迁偶极矩(极接近于吸收光时发生的电荷位移)呈 θ 角(见图 6-14),表示电磁波振幅的矢量 **E** 在跃迁矩方向中的投影正比于 $\cos\theta$,所吸收的能量将正比于振幅强度。对于与跃迁矩成 θ 角之偏振方向的光,其消光系数 ε_θ 与平行于跃迁矩的偏振方向光之消光系数 $\varepsilon_\parallel$ 的比值为

$$\varepsilon_\theta/\varepsilon_\parallel = \cos^2\theta \qquad (6.4\text{-}2)$$

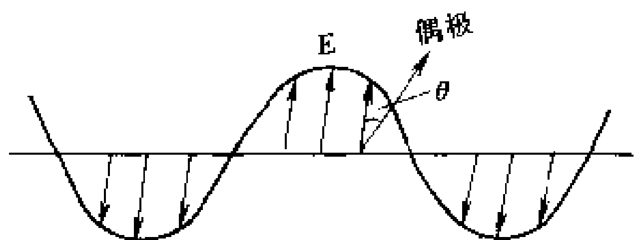


图 6-14　光偏振方向和跃迁矩方向间 θ 夹角

当 $\theta=90^\circ$ 时，$\varepsilon_\theta=0$，分子中所含发色团取向使跃迁矩平行于光的偏振方向时，偏振的激发光最可能被吸收。如果在光吸收至发射荧光约 10^{-9} 秒(激发态电子寿命)或稍长一些时间内分子的转动未呈现，此时的发射光也将是偏振的。但因布朗运动(包含布朗转动)的存在，通常会产生某种消偏振作用。这种消偏振作用可用于度量布朗运动的速率，从而获得带有发色团分子的大小与不对称性的信息。

以起偏振器的检测装置测量持续时间极短(约 10^{-9} 秒)的光脉冲照射后的荧光发射，可将偏振平行于入射脉冲的发射光强度($I_{\parallel}$)与偏振垂直于入射脉冲的发射光强($I_{\perp}$)相比较。发射的各向异性(A)定义为

$$A=(I_{\parallel}-I_{\perp})/(I_{\parallel}+2I_{\perp}) \tag{6.4-3}$$

发射光的分子有更多时间来转动，各向异性 A 会随时间指数地衰减，即

$$A(t)=A_0e^{-3t/\rho} \tag{6.4-4}$$

式中　ρ——代表转动松弛时间

由于该方法可以测得很短的松弛时间，所以已成为探测分子结构变化的新工具。

发射荧光的发色团与光吸收的基团并不一定是同一个，在适当情况下激发能可以从一个发色团转移到其它的发色团，例如光激发发生在苯基丙氨酸或酪氨酸中，而观察到的荧光是由色氨酸发射的。因为色氨酸的激发态与苯基丙氨酸或酪氨酸的比较，其能级是最低的(吸收波长是最长的)，于是激发能可转移给色氨酸。

辐射磷光也是消激发的一种方式，在发射磷光前，激发分子 S→T 系间窜跃转成较长寿命的激发三线态，这种激发单线态转变为激

发三线态和激发三线态辐射磷光后转变为基态单线态的跃迁，在量子力学的选择法则中是禁止的，实际上也就是说这种转变的速率非常低。在室温时系间窜跃的无辐射衰变比磷光发射的可能性大得多，所以磷光经常是在很低的温度场合下才观察到，三线态的辐射寿命较长（约 10^{-4}～10^{-2}秒）。现已确认磷光是三线态的性质，但观察磷光的实验条件较苛刻，杂质的猝灭作用特别敏感，在全氟化碳高纯溶剂中，对流动溶液中的磷光可有效地进行观察。大部分的观察是在刚性玻璃溶液中进行的，一般是以有机溶剂的混合物（例如乙醚、异戊烷、乙醇）在 77K 使之成为玻璃体，在室温下可用有机塑料或硼酸和其它无机玻璃的熔融体。

6.5 磁共振方法

研究生物物质及其过程时磁共振方法也已变得很重要了，磁共振方法有两种技术手段，即电子顺磁共振和核磁共振。一个自旋着的带电粒子具有一磁偶极矩，这可用一个沿着自旋轴的矢量来描写。由于自旋是量子化的，磁矩也需用自旋量子数来度量，只可能有某些值。如果一个粒子具有非零自旋，它将与外加磁场相互作用。相对于场，自旋矢量只能取某些量子力学规则所允许的取向，这些在场中的不同取向相当于不同的能级。

6.5.1 电子顺磁共振

当物质中含有未成对电子时，便有净的电子自旋和相应的磁矩，在外磁场中可导致电子磁共振现象，一般称作为“电子顺磁共振（简记 EPR）或“电子自旋共振”（简记 ESR）。顺磁共振谱可广泛应用于研究有机自由基、过渡元素络合物（如过渡族金属蛋白质）等在新陈代谢中的作用。

假定物质中一个不配对电子与其它电子或核没有磁的相互作用，它的自旋矢量在外加磁场强度 H 中有两个允许的取向，相应地产生两个磁能级，能量接近于 $+\mu_o H$ 和 $-\mu_o H$，$\mu_o = eh/4\pi mc$

($=0.9274\times10^{-27}$焦耳/高斯),称为波尔磁子。发现符合共振条件而在这两能级间跃迁时吸收的能量是

$$h\nu = 2.0023\mu_o H \tag{6.5-1}$$

或

$$\nu = g(eh/4\pi mc)(H/h) \tag{6.5-2}$$

式中 e ——代表电荷;

h ——代表普朗克常数;

m ——代表质量;

c ——代表光速;

g ——代表分裂因子,对于只有自旋角动量的自由电子,它就是朗德因子(实验证实 $g=2.0023$)。

当电子参与原子或分子中成键时其 g 值并非就是 2.0023,它会有一定变化。从峰位或 g 值变化可以研究化学键的本性以及化学环境的影响。

实际上,由于电子与其它电子和核发生磁相互作用而复杂化,可以使 ESR 谱发生超精细分裂。例如图 6-15 所示的铜-伴白蛋白络合物的电子顺磁共振谱。图中左边谱线是 d 电子与铜自旋核相互作用而分裂形成 4 个小峰,g 的平均值为 2.30;右谱线是由于与 N 配合基相互作用产生的。

6.5.2 核磁共振(NMR)

核磁共振在生物化学领域的研究中也得到了应用,它限于研究自旋不等于零的核,核的运动也不是孤立的,均与核外电子、周围环境的原子和分子有相互作用,由此表现出来的核磁共振谱可提供物质的化学结构和反应过程的信息。

随着原子序数和核的同位素质量值的不同,自旋量子数 I 可

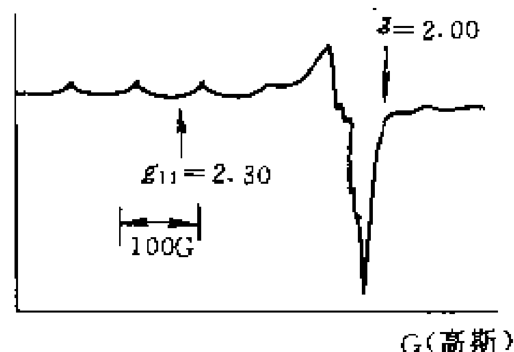


图 6-15 铜-伴白蛋白络合物的 ESR 谱

取半整数或整数值，例如${}_1^1H(I=\frac{1}{2})$、${}_1^2D(I=1)$、${}_7^{14}N(I=1)$、${}_8^{17}O(I=\frac{5}{2})$、${}_6^{13}C(I=\frac{1}{2})$、${}_{15}^{31}P(I=\frac{1}{2})$和${}_9^{19}F(I=\frac{1}{2})$等。含有质子的共振谱做得最多。其它稳定核在自然界并不丰富，特殊需要利用它们的信号以检测物质核磁共振时，就必需人工加浓。质量数和原子序数都是偶数时 $I=0$，这类核不发生核磁共振，例如${}_6^{12}C(I=0)$和${}_8^{16}O(I=0)$。

具有自旋量子数 $I\neq0$ 的原子核有一定的角动量 P_I、核磁矩 μ_I 和 μ_I 沿磁场的分量 μ_{IZ}，即

$$P_I=\sqrt{I(I+1)}\frac{h}{2\pi} \tag{6.5-3}$$

$$\mu_I=\nu_I P_I=g_I\sqrt{I(I+1)}\beta_n \tag{6.5-4}$$

$$\mu_{IZ}=\nu_I P_{IZ}=g_I m_I \beta_n \tag{6.5-5}$$

式中 m_I——代表磁量子数；

g_I——代表朗德因子；

β_n——代表核磁子；

ν_I——代表磁旋比。

其中 m_I 只能取 $I,I-1,I-2,\cdots,-I$ 等共 $2I+1$ 个值；对于质子 g_I 等于 5.586；$\beta_n=eh/4\pi M_p c=5.0504\times10^{-31}$焦耳/高斯（$M_p$ 为质子质量）；因核带正电，β_n 应为正值，它是度量原子核磁矩的单位；γ_I 是核的磁矩和自旋角动量之比

$$\nu_I=\frac{\mu_I}{P_I}=g_I\beta_n/\frac{h}{2\pi} \tag{6.5-6}$$

当一个原子核被置于磁场 H_o 中，其磁矩 μ_I 与 H_o 间相互作用会产生不同的量子化磁能级。

$$E_m=-g_I m_I H_o \beta_n \tag{6.5-7}$$

对于 $I=\frac{1}{2}$的核，例如${}_1^1H(I=\frac{1}{2})$，则 $m_I=\frac{1}{2}$和$-\frac{1}{2}$，二者的能量差与磁场强度 H_o 成正比。在磁场中原子核受到不同能量($h\nu$)的电磁波辐射后，即按

$$\Delta E = h\nu = g_I\beta_n H_o \quad (6.5\text{-}8)$$

条件(选择规则 $\Delta m_I = \pm 1$),可从基态($m_I = \frac{1}{2}$)跃迁到较高的能级($m_I = -\frac{1}{2}$)导致产生核磁共振吸收谱。大多数含 C、H、O 三元素的有机化合物,都是研究${}^1_1H$ 或其同位素${}^2_1D$ 的核磁共振以推定该化合物的结构。参见图 6-16 嘌呤在 0.8M 水溶液中的核磁共振谱(实验中常以重水 D_2O 代替)。

核与其周围环境的相互作用,产生一些可借此推定结构的重要效应。例如对于实际化合物中相同的氢原子核,由于其周围的电子环境不一样而使氢原子核外围电子在外加磁场 H_o 感应下,产生不同的对抗磁场,导致不同的屏蔽效应,使原子核实际所需共振吸收能量(或相应的磁场强度)将以不同程度地位移。所以同一化合物之中,各种不同环境的氢原子核或不同化合物中的氢原子核的共振频率具有一定差异,具体数值与该质子所在处的化学结构有关。若固定电磁波频率,质子受到较大的屏蔽作用,则要在较高的外加磁场下才会共振;如果固定外加磁场强度,则会在较低的照射频率下共振。以下公式定性地说明此关系:

$$\Delta E = h\nu = g_I\beta_n(1-\sigma)H_o \quad (6.5\text{-}9)$$

式中 σ——代表屏蔽常数。

这种因原子核的物理化学环境不同,而产生的共振吸收谱峰的化学位移,可作为推测化学结构的依据。图 6-17 是高分辨率的乙醇核磁共振谱。

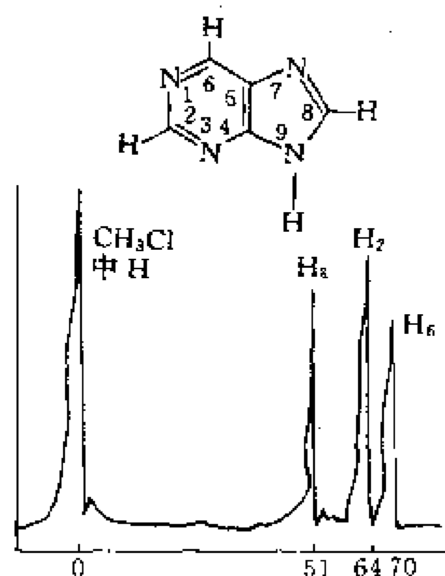


图 6-16 嘌呤在 0.8M 水溶液中的核磁共振谱

(谱中外加参考,CH_3Cl 的质子为零,依序峰位是嘌呤分子中第 8 位、第 2 位和第 6 位质子的共振吸收,第 9 位的 N—H 上质子未出现峰位)

为使所测定的数据精确可靠，仪器性能和测试方法上已作了一些改善措施。但大分子的核磁共振谱十分复杂。

考虑各种基团上质子共振峰的化学位移(δ)时，必须选择某一物质的共振峰作为标准，现国际化学协会建议统一以$(CH_3)_4Si$(简称TMS)参考物作为标准，其标准吸收峰为零，向左为正值。而一般化

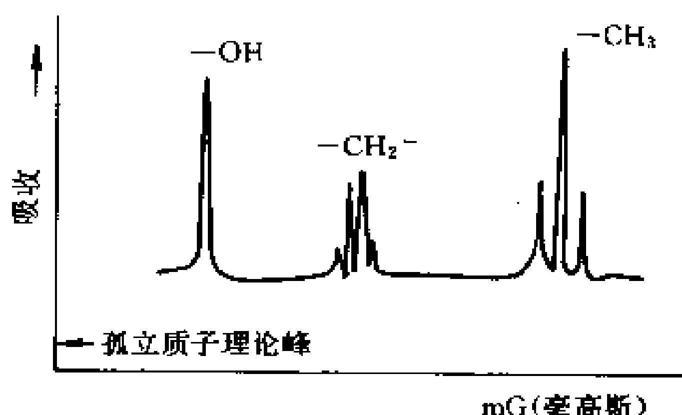


图 6-17　乙醇(加痕量酸)的 NMR 谱

(高分辨率～$1/10^7$)

合物质子共振峰都出现在右边，所以 δ 为负值。化学位移定义为：

$$\delta = \frac{\nu_{样品} - \nu_{标准}}{\nu_{标准}} \times 10^6 = \frac{H_{样品} - H_{标准}}{H_{标准}} \times 10^6 (ppm) \quad (6.5\text{-}10)$$

δ (化学位移)是一无因次的量，ppm 为百万分之一的缩写。

值得注意，1960 年以前的文献大多采用其它参考物作标准，如苯、环已烷、氯仿、水等，所得的 δ 值是各有不同的，另外 δ 的符号在图表时可能被删去。

6.6　旋光光谱与圆二色性

螺旋状或多层次折叠状结构的存在是各类生物聚合物具有的特征之一。例如 α 螺旋或 β 折叠构象的多肽和蛋白质，单股、双股和三股螺旋构象的聚核苷酸，以及螺旋构象的多糖类等分子不对称性，对

它们具有的生物功能至关重要。在生物聚合物中检测这种结构及其具有量，对了解这些聚合物分子的作用有重要意义。借助旋光色散和圆二色性技术可以测定生物物质分子链盘曲折叠的二级结构。

6.6.1 光的旋光(色散)性与圆二色性之基本知识

电磁波是横波，其呈现的电场和磁场矢量或振动方向总是互相垂直的，并与电磁波传播方向相互垂直。图 6-18 以外部参考系统表征平面偏振情况，若电磁波沿 x 轴为传播方向，则电场矢量指向 z 轴而磁场矢量指向 y 方向，这些场矢量随传播方向在 x 轴上某一点以频率 ν 振荡。这种 E 只具有唯一方向振动的光称作平面偏振光，而 E 矢量(z 轴)和传播方向(x 轴)所形成的平面或以 H 矢量和 x 轴所形成的平面，称作偏振光的偏振面。

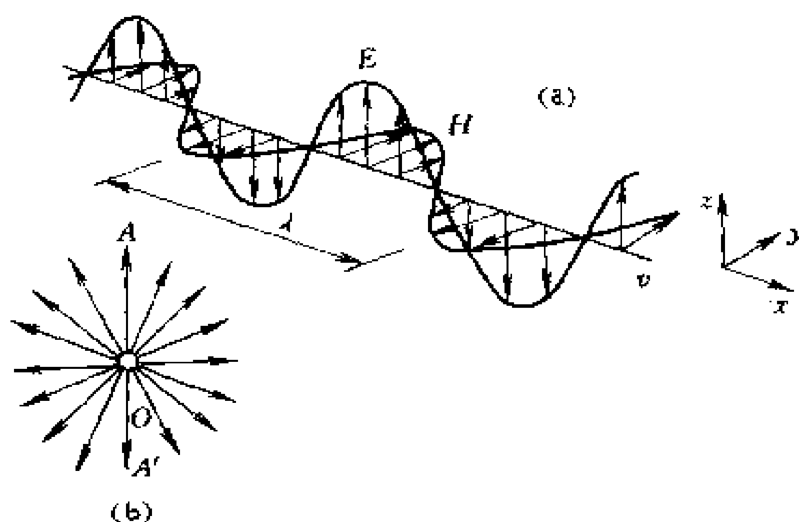


图 6-18

(a)平面偏振辐射和(b)通常自然光

通常自然光是由具有垂直于光波传播方向的电场矢量 E，在一切振动方向形成所有偏振面合成的。当它通过具有双折射性晶体(例如 $CaCO_3$ 冰晶石)后，会产生传播方向不同而电场 E 都只在一个方向上振动的两条平面偏振光线。

电磁波可用其电场(和磁场)的振幅和方向(相位)来表征。一条振幅 a_o、位相 ωt (ω 为角速度)的平面偏振光表示为:

$$E = \overline{OA} = a_0 \cos \omega t \qquad (6.6\text{-}1)$$

可视为是周期和振幅 r 都相同，而旋转方向相反（即一向右和一向左）的两个圆偏振光所合成的，而圆偏振光又可看作在 x 轴上任一点电矢量是垂直于此轴的平面中旋转（每秒 ν 周），电矢量的点运动是螺旋形的，它在 x 轴方向传播速度为 $c = \lambda\nu$（波长 λ 相当于完整地旋转一周），参见图 6-19。面对光的传播方向 x 轴〔在图 6-19(b)中垂直纸面〕，顺时针方向螺旋的称右旋圆偏振光；逆时针方向的称为左旋圆偏振光。原来偏振面为 $\overline{AA'}$ 的平面偏振光，在任何时间 t 都可看作是振幅相等的左旋和右旋圆偏振波组合起来的，即左右两个圆偏振分量之和。

当偏振光照射具有旋光性物质时，由于旋光物质对振幅相等的左右圆偏振波标志色散大小的折射率不同，使两者的传播速度 ν_L 和 ν_R 不一样。例如，左圆偏光 ν_L 小于右圆偏振光 ν_R，所以通过旋光物质溶液后，左圆偏振光的位相要比右圆偏振光的落后些，即圆偏振光的电向量往右转过的角度，将会大于左圆偏振光电向量往左转过的角度，参见图 6-20(a)。因此合成的平面偏振光净向右旋转了一个 α 角，称该物质具有右旋性质。

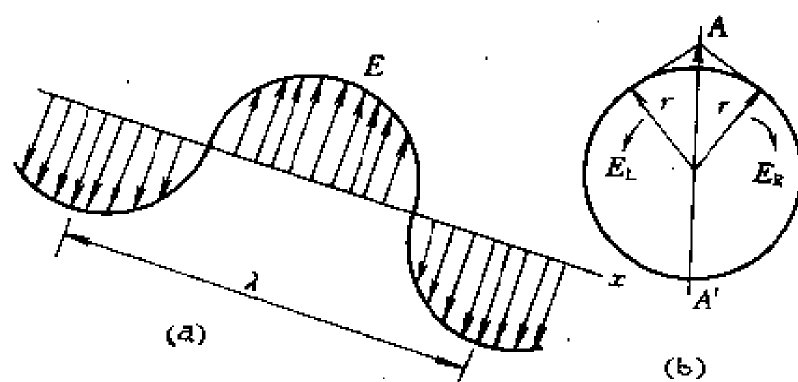


图 6-19

(a)圆偏振光与(b)等同的两条圆偏振光合成在 $\overline{AA'}$ 一个方向上电场 E 振动的平面偏振光

通常称物质透射光偏振面发生改变为旋光，偏振面改变的角度

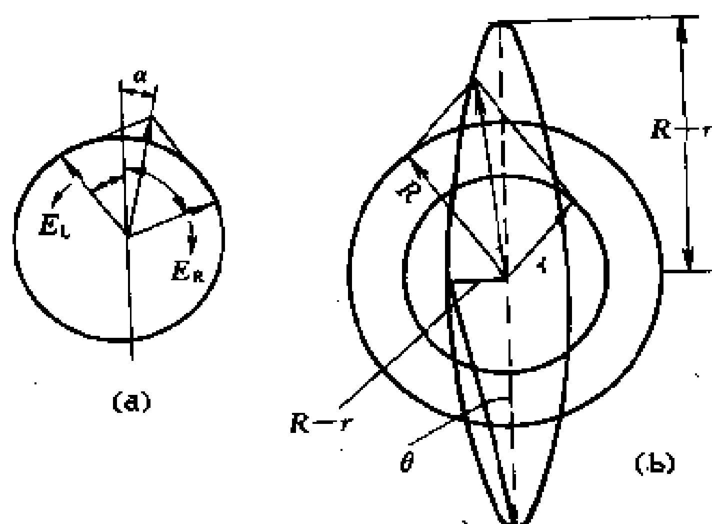


图 6-20
(a)右旋性物质两圆偏振的合成;(b)椭圆偏振

称为旋光度,通过厚度 1×10^{-3}m 浓度 $1kg/m^3\times10^{-3}$旋光物质的溶液时产生的旋光度称旋光率。旋光率随平面偏振光波长改变而产生的变化即为旋光色散,其曲线即旋光色散光谱。

倘若平面偏振光照射物质而相互作用后,对于左旋和右旋圆偏振光能量的吸收程度不同,会导致左右旋圆偏振光的能量变化或振幅 R 和 r 也不相同。两个振幅不相等,且沿左右相反方向螺旋运动的圆偏振光经组合后,其电向量 E 形成椭圆偏振,参见图 6-20(b)。可见,椭圆偏振光是由于左右圆偏振光被吸收的程度差异(即左右圆偏振光吸收系数 ε_L 和 ε_R 不同)而引起的,这种现象被称作圆二色性,于是旋光物质对左右圆偏振光的消光系数之差 $\Delta\varepsilon=\varepsilon_L-\varepsilon_R$ 就表达了圆二色性。

概括地说,当平面偏振光照射物质时,左旋和右旋圆偏振光的传播速度不同(标志色散的折射率 n_L 和 n_R 大小不同所引起的)导致旋光现象;两者的被吸收程度(即吸收系数 ε_L 和 ε_R)不同导致圆二色性现象。它们的电向量 E 有规则地旋转而分别描写成左(或右)旋或者椭圆。

6.6.2 旋光现象和圆二色性的表征

假定平面偏振光进入具有旋光性物质内深度为 l 的某一点时，左右圆偏振光合成的平面偏振光旋转了一个角度 α〔例如图 6-20(a)〕,右旋的给予正号,左旋的给予负号,它与物质折射率的关系为

$$\alpha=\frac{\omega l}{2c}(n_L-n_R)=\frac{\pi l}{\lambda_0}(n_L-n_R) \tag{6.6-2}$$

式中 λ_0——代表真空中波长。

在指定波长 λ 和温度 T 时,物质的旋光性质可用比旋光度(或称旋光率)表示,即

$$[\alpha]_\lambda^T=\frac{\alpha_\lambda^T}{l\rho} \tag{6.6-3}$$

引入密度 ρ 之目的是为了消除热膨胀引起 α/l 对温度的依赖性。在溶液状态进行实验时,溶质的比旋光度(或旋光率$[\alpha]_\lambda^T$)和摩尔旋光度$[m']$通常分别以下式表达:

$$[\alpha]_\lambda^T=\frac{100\alpha_\lambda^T}{lc} \tag{6.6-4}$$

和

$$[m']=[\alpha_M]_\lambda^T=\frac{M}{100}[\alpha]_\lambda^T$$

$$=\frac{M\alpha_\lambda^T}{lc}(\text{度}\cdot\text{米}^{-1}\cdot\text{摩尔}^{-1}\cdot\text{米}^3\cdot 10^{-3}) \tag{6.6-5a}$$

或

$$[m']=[\alpha_M]_\lambda^T=\frac{M}{100}[\alpha]_\lambda^T\frac{3}{n^2+2} \tag{6.6-5b}$$

式中 α_λ^T——代表观察到的旋光(度);

l ——代表样品管的长度〔以米×10^{-1}(10 厘米)为单位〕;

c ——代表以 kg/米^3×10^{-1}表示的溶质浓度;

M——代表溶质相对分子质量;

n ——代表介质的折射率;

$\frac{3}{n^2+2}$——代表修正介质对分子所感受的有效场之轻微影响项。

在研究生物聚合物时，常将 M 作为平均残基重量，此时 $[\alpha_M]_\lambda^T$ 称作平均残基旋光。

圆二色性的特征表现是物质对左旋右旋两种圆偏振光的吸收系数 ε_L 和 ε_R 不同，导致两者合成后电向量不再在一条直线上运动，而是沿着椭圆运动，所以可用椭圆率 θ 来表达椭圆形状和 ε_L 和 ε_R 的差别。对于照射管长 l 和浓度为 c 的溶质之平面偏振光，近似地认为椭圆率 θ 是：

$$\theta_\lambda^T \approx \tan\theta = \frac{R-r}{R+r} \approx 0.576lc(\varepsilon_L - \varepsilon_R) \tag{6.6-6}$$

比椭圆率和摩尔椭圆率分别定义为

$$[\theta]_\lambda^T = \frac{100\theta_\lambda^T}{lc} \tag{6.6-7}$$

和

$$[\theta_M]_\lambda^T = \frac{M}{100}[\theta]_\lambda^T = \frac{M\theta_\lambda^T}{lc} \tag{6.6-8}$$

由于 n_L, n_R（即 Δn 或$[\alpha]$）和 ε_L、ε_R（即 $\Delta\varepsilon$）也是波长 λ 的函数，于是必须在不同的波长下，对$[\alpha]$所作的旋光色散曲线和对 $\Delta\varepsilon$ 所作的圆二色曲线来研究光学活性物质的特性和结构。图 6-21 所描述形状是它们一般的曲线。当 $\lambda < \lambda_{极大}$时，$n_L < n_R$（$[\alpha]$为负），则该物质为右旋的（dextrogyres），如 $n_L > n_R$（$[\alpha]$为正），则是左旋的（laevogyres）。旋光色散曲线只有一峰尖和峰谷，并在长波方向出现的是峰尖 P 或峰谷 T，分别称为简单的正科顿效应曲线或负科顿效应曲线。峰尖 P 和峰谷 T 处旋光值的差称振幅 a，b 为幅宽。当出现 n 个峰尖和峰谷时称为复合科顿效应曲线。

当激励频率低的长波时，振子与激励力同相，接近共振时，振子振荡更激烈，使最初相位关系逐渐丧失，在很高的激励频率处，振子比激励场的位相变成滞后 180°，在折射中穿透光速似乎比入射光速超前，且光速在介质中似乎大于真空的，于是旋光效果是改变旋光符号。如果长波处旋转是正的，那么经$[\alpha]=0$ 后在短波处变为负，这种在吸收带附近的变号被称为科顿效应。对于每个旋光现象将出现一个圆二色性吸收带和旋光色散的科顿效应。

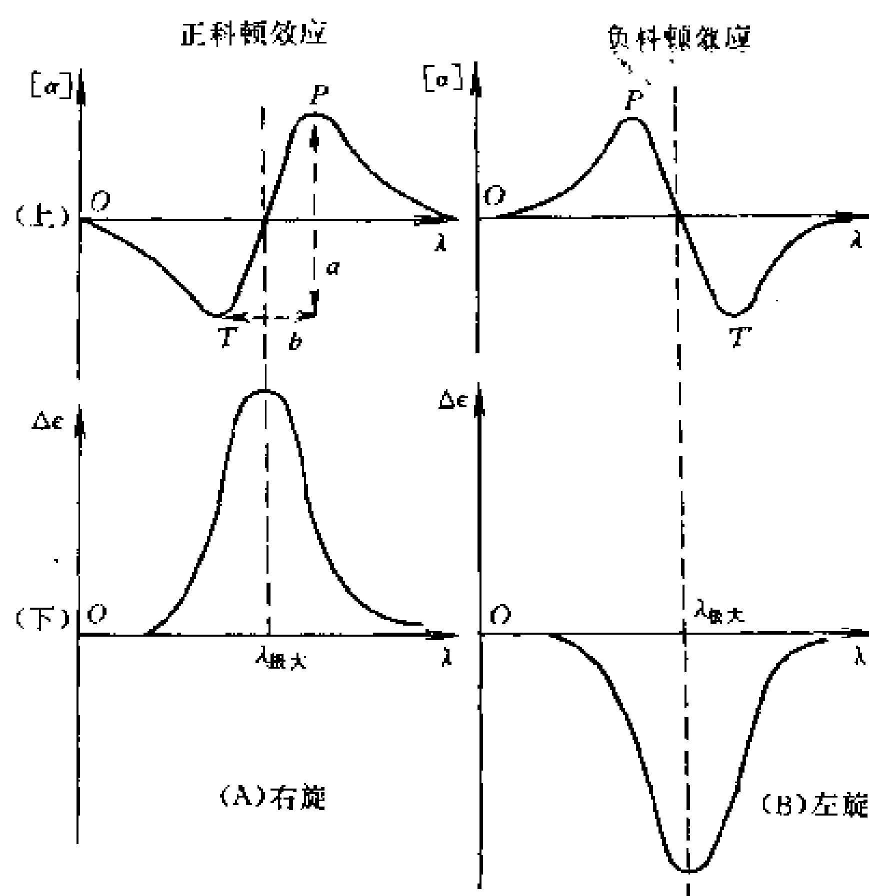


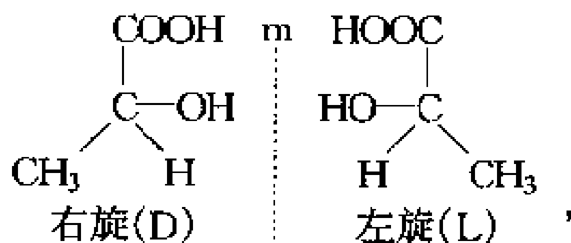
图 6-21
(上 A)右旋和(上 B)左旋发色团的旋光色散曲线;
(下 A)右旋和(下 B)左旋物质的正和负圆二色曲线

一种旋光性物质可以表现出对左右圆偏振光的吸收有差别,则在所有波长上对左右圆偏振光的折射指数也将不同,图 6-21 显示了圆二色性和旋光性间及其依赖波长的关系。发展测量这两种现象的技术是因它们各有优点。圆二色性曲线具有较高的分辨率,而复杂分子中并非一切电子跃迁(吸收带处)都能呈现出可测的旋光,只有电子由基态吸收光能而跃迁到激发态时,伴随着光强度的减弱,使分子整个电荷分布发生改变(即极化),并与光波电磁场相互作用,影响到光传播速度及折射率,方能呈现出旋光现象。此外,旋光色散曲线重叠严重而难于分辨时,圆二色性谱容易将两个电子旋光跃迁吸收

带的正圆二色性和负圆二色性分清。然当旋光跃迁位于现有仪器不能检测的波长时,用旋光色散测量可使旋光色散曲线远远地超过吸收带,以近紫外或可见光范围中的旋光色散来研究远紫外跃迁的旋光性质更有益。

6.6.3 光学活性与物质结构和组成

折射的旋光性和吸收的圆二色性是偏振光与物质不对称性结构相互作用结果所产生之现象的两个方面。通常,光学活性物质所具有的旋光性或圆二色性是由二种原因引起的。一种是晶格中分子空间排列不对称导致形成左旋和右旋异构体,例如右旋和左旋石英晶体。另一种是由于分子本身不对称性造成的,这是生物化学和医药界所关心的。仅不具有对称中心、对称面和反轴(不过可以有对称轴)的分子才可能具有光学活性。例如乳酸分子的结构:



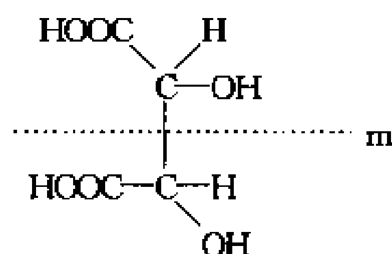
它能满足光学活性的条件,分子中有四个以上不同基团或原子,空间结构又不能与它自身的镜像重合,但这两种互为镜像的旋光异构体之间都有可能通过假想的镜面 m 使对方的镜像与各个自身重合,所以也称它们为镜像对映体。

六螺烯分子呈非平面螺旋型结构,也有旋光性,因为圆偏振波与其螺旋形分子相互作用,产生离域 π 电子沿螺旋迁移运动,引起平行于螺旋轴的感应电场(电偶极矩)和磁场(磁偶极矩)。于是对左右圆偏振光应具有不同的吸收率和不同的折射指数。一个左手螺旋表现的旋光效应与右手螺旋表现的相反,这由于电子的盘旋是以相反的方向进行,使磁偶极矩相互颠倒造成的。这类物质中存在着本征光学活性不对称生色基。

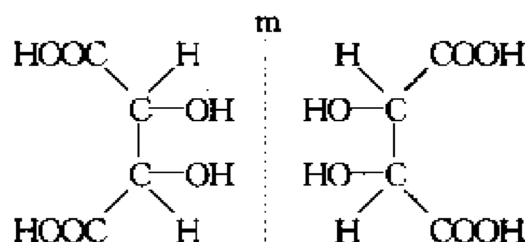
另一类旋光色散曲线,是由于对称生色基与一不对称分子环境

相互作用而变成不对称生色基而呈现的。例如 =O 对称生色官能团在不对称环境中(如 CH_3 =O)会诱导出光学活性来。

在有机化学中物质,常以分子含“联结四个不同键的不对称碳原子”来推定其具有光学活性。实际上,含有不对称碳原子的分子不一定是旋光性物质,例如内消旋酒石酸的结构为



其分子内含有基团排列方向相反的一对不对称碳原子,导致它内部的右旋构型和左旋构型的旋光性自行抵消。将这种分子内部存在对称面的物质称作内消旋物。此外,还发现外消旋混合物,它是不易分离的右旋分子和左旋分子相等数量所组成的,例如右旋和左旋酒石酸分子等量混合物



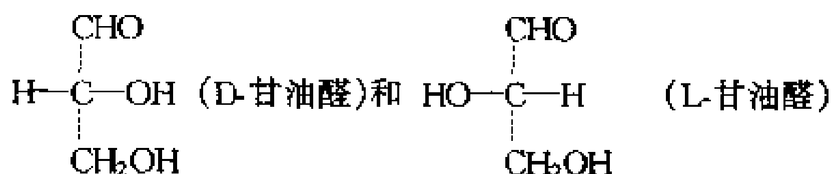
又如六螺烯分子可有右手或左手螺旋型两种形式存在,它们等量混合便不具有旋光性。

氨基酸和多肽的 α 碳原子大部分具有四个不同的取代物,其一级结构(即只表达氨基酸顺序结构)原来就是不对称的,因此 α 碳邻近的电子跃迁是旋光性的。许多二级结构(即仅表达分子伸展形状如螺旋或折叠等构象)螺旋状的生物聚合物,使链骨架中或螺旋排列的侧基团的电子跃迁成为旋光性的。这已引起人们的特别注意。大

分子的三级结构(即三维空间构象)中某些基团被挤进一个不对称环境里而产生不对称电场,使电子跃迁发生旋光性。

物质的比旋光度会受温度、溶质浓度和溶剂的影响而变化,其原因是多方面的。例如,温度会影响旋光异构体的平衡常数,还会影响溶质和溶剂、溶质和溶质之间的相互作用,从而影响到旋光。不同溶剂对溶质的旋光性的影响也不同,所以用旋光法比较同一基团结构时应该以相同的溶剂进行实验。溶质浓度的影响,在一般情况下,不超过2%的影响不会太大。

旋光和圆二色性的测定,通常应用在确定分子的几个可能结构中与实验结果比较符合的结构。由于旋光性质对结构中的微小变化非常敏感,所以推定时要特别慎重。一般,旋光性测定可以确定分子的相对构型,即右旋〔标以(+)〕还是左旋〔标以(-)〕。若要推定分子的真正立体化学绝对构型,则常采用化合物降解和已知立体结构分子相比较〔原以甘油醛的两种空间异构体或丝氨酸 $HOCH_2$-$CH(NH_2)COOH$〕作标准,如甘油醛的立体结构如下所示:



甘油醛中心碳原子所连接的四根键形成扭弯四面体构型,连接H和OH的键在纸面上方(示以实线),连接其它碳原子的键伸向纸面下方(示以虚线)。类同的空间构型标以 D 或 L 符号,才确定了绝对构型。例如,D(+)甘油醛在HgO催化下氧化所得的产品是(-)甘油酸,因其中心碳原子连接四根键的构型不太可能变化,所以(-)甘油酸的空间构型仍是 D 构型。

旋光法也用于一些旋光性物质的分析和纯度鉴定,例如具有旋光性的糖含量的分析测定等。

不过,旋光法主要应用于研究具有旋光性化合物的空间三维结构,例如在5α甾体化合物中酮基的位置不同时其旋光色散曲线也随

之有了明显的区别。图 6-22 显示了 C=O 基三种不同位置的甾体旋光曲线。

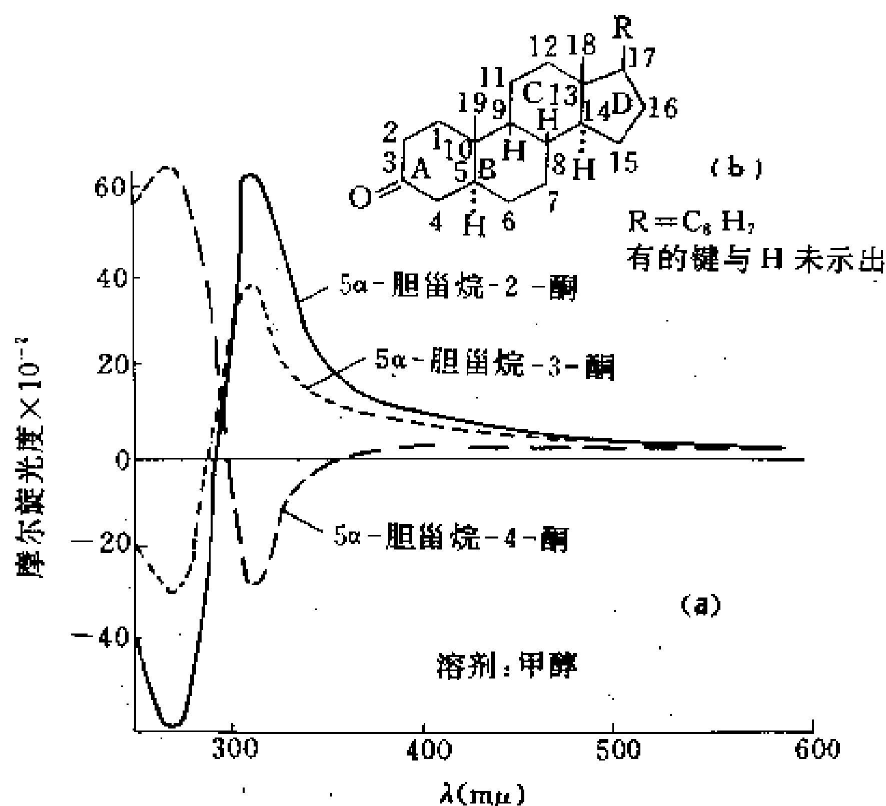
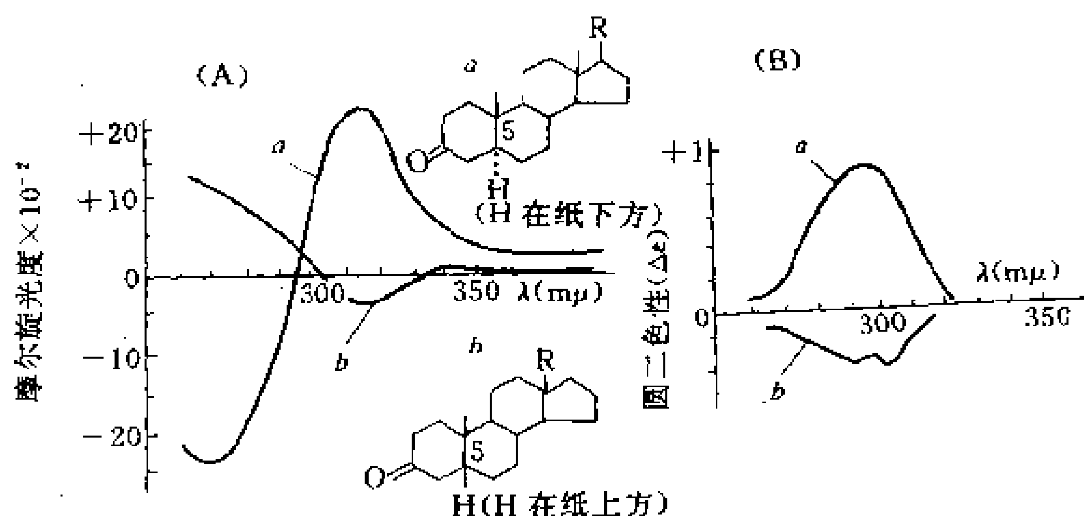


图 6-22

不同酮基位置的旋光色散(科顿效应)曲线(a)和 5α-胆甾烷-3 酮分子结构(b)

化合物的旋光性在任何波长处都是分子中各个光学活性吸收带贡献的代数和,这些吸收峰叠加结果会使旋光谱峰不易分辨。对于圆二色谱,〔θ〕值只在吸收峰有较大值,当某物质有几个生色基团时,便在相应波长处出现几个对应的极大。从而易发现在旋光谱中被掩盖或混淆的生色基团,图 6-23 是 5 号位 H 在纸下方的 5α-甾体-3-酮和 5 号位 H 在纸上方的 5β-甾体-3-酮两空间异构体的旋光色散和圆二色曲线,根据图 6-23 中的曲线所对照之 R 为 OH 基和碳 6~7 位间双键的胆甾烯-3-酮还原产物之实验曲线可以确定产物的构型。

利用螺旋性的测定来研究溶液中球状蛋白质方面已取得一些进展。图 6-24(a)是对聚-左-赖氨酸多肽的不同构象之椭圆度与波长



· 图 6-23

(A)(*a*)5α和(*b*)5β-甾体 3-酮(R═OH)的旋光色散与(B)圆二色性曲线。(在二噁烷中)

关系曲线(即圆二色性曲线)。无规线团的聚-左-赖氨酸多肽在 λ= 197、217 和 237(mμ)处分别有负值强峰、正值强峰和负值很弱峰等

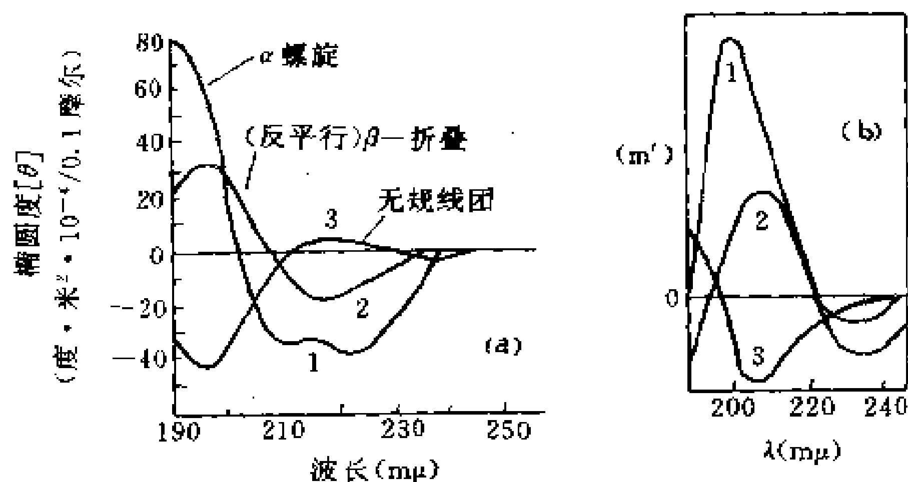


图 6-24

(a)不同构象之聚-左-赖氨酸的椭圆度与波长关系曲线;(1-α 螺旋,2-β 折叠,3-无规则卷曲)

(b)不同构象之聚-左-赖氨酸的旋光色散曲线(1-α 螺旋,2-β-折叠,3-无规则卷曲)

三峰值;α-螺旋构象在 191 附近、207 和 222(mμ)处分别有正值强峰

和两个有些重叠的负值强峰;β 构象分别在 195mμ 和 217mμ 处有正值强峰和负值强峰等两个峰。

图 6-24(b)是聚-左-赖氨酸的旋光色散光谱、α-螺旋、β-折叠和无规卷曲的旋光色散曲线各不相同;由此可推算右手螺旋的相对含量。

6.6.4 粘性流中的取向作用与二色性

在受切变的液体中,会有一力矩施于长形大分子上,于是大分子取向倾向于其长轴平行于液流的方向。一恒定的切变率作用会产生一种取向的定态分布。这种切变作用会引起流动二色性,用切变二色性研究纤维状的肌动蛋白的结果示于图 6-25。无二色性的球性肌动蛋白单体的聚合作用形成具有强烈二色性的纤维。这种纤维状蛋白质是与腺二磷组成络合物形式存在。当溶液因切变取向时,所观察到的腺二磷和蛋白质芳香侧链吸收的偏振方向不同,形成在 λ = 275mμ 附近的二色性改变符号。

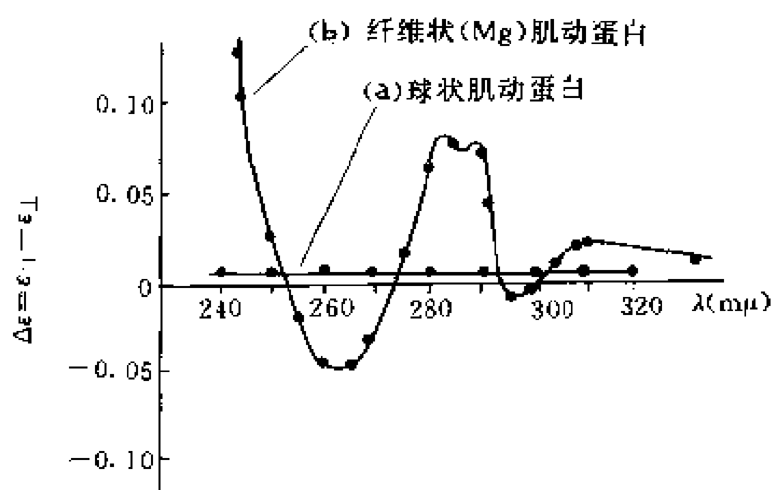


图 6-25
(a)球状肌动蛋白和(b)纤维状肌动蛋白的流动二色性

6.7 蛋白质的组成和顺序测定

研究蛋白质的详细结构性质,首先需要测定其氨基酸组成和顺序(即一级结构),这就要求将蛋白质专门纯化,降解后利用它们各种

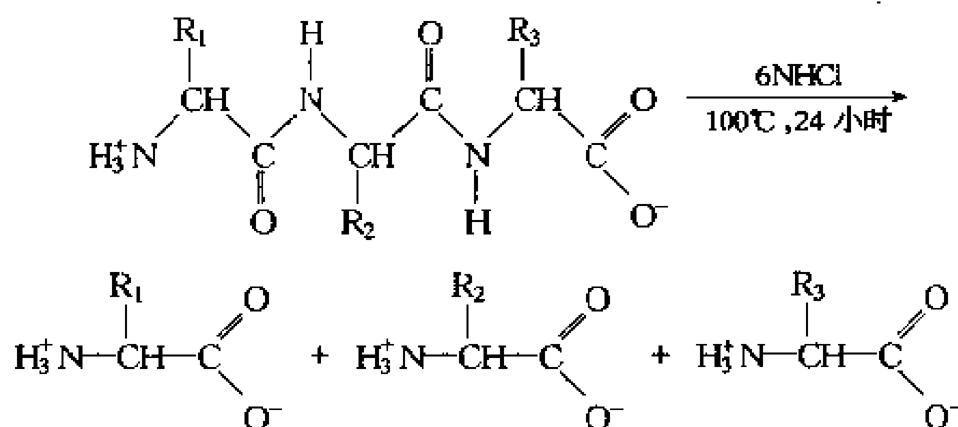
性质(带电性质、相对分子质量等)进行鉴定,并分析多肽合成过程中氨基酸的取代作用所反映的性质信息等,于是发展了有效纯化技术(包括超离心、各种电泳和层析等),氨基酸顺序的化学测定法。

6.7.1 氨基酸组分的测定

蛋白质分子中氨基酸组分的含意系指组成多肽链分子的每一种氨基酸的数目。氨基酸的组分和顺序不同可以形成各种具有独特性质的蛋白质,所以要深入地研究每一种蛋白质性质则务必测定其组分,实验步骤大致如此:

(1)把蛋白质或多肽链降解为其成分氨基酸

通常,降解是采用在 6N HCl 中煮沸的方法(酸解)来实现。肽链的水解会释放出游离的氨基酸,例如



不过,以盐酸水解的降解方法会导致部分色氨酸吲哚环的破坏,还会使谷氨酰胺和天冬酰胺侧链上的酰胺基团失去氨基而生成谷氨酸和天冬氨酸。于是需选用一些方法(如光谱吸收等)来测定色氨酸的量。值得注意的是:对于酸水解产物的组成分析中所测得的谷氨酸量实际上是谷氨酰胺与谷氨酸之和,天冬氨酸的量是天冬酰胺与天冬氨酸之和。在降解方法中有时也用碱水解,现又开发了酶水解。

(2)将酸解所得的各种游离氨基酸进行分离

氨基酸分离通常是用离子交换层析法,以便对各类氨基酸进行定量分析。利用被分离物质与固定相(如树脂)间相互亲和力的大小是层析分离技术的一般理论基础。例如,由某种化学性质不活泼的

高分子化合物组成的树脂含有弱碱性侧链成分，当 pH=7 时，它能带正电，并在含游离天冬氨酸和赖氨酸的溶液中能与带负电的天冬氨酸结合，而带正电的赖氨酸却不能结合到树脂上。若将含有上述两种氨基酸溶液加到这种带正电的弱碱性树脂填充柱上，赖氨酸与树脂的亲和力较小，它通过柱的速度比天冬氨酸的快，于是先流出柱的溶液是含赖氨酸组分，从而使两种氨基酸得到分离。

科技的进展，已生产出对所有天然氨基酸分别具有不同亲和力的树脂。使用这些树脂能有效地把氨基酸混合物中的各个组分分离出来。这种层析分离技术的机理是十分复杂的，其分离效果是与氨基酸分子侧链的极性、α-氨基和羧基 pK 值的微小差异、树脂侧链的性质、溶液 pH 值、溶剂效应以及其它因素(如组分浓度与组成比、温度)密切相关，这种分离技术常通过改变洗脱缓冲液的 pH 值甚至溶剂种类来增强层析柱的分离性能。例如先用一种 pH 的洗脱缓冲液洗涤层析柱，让那些与树脂结合得不太紧密的氨基酸被洗脱分离后，适当改变洗脱缓冲液的 pH 值，促使某些与树脂紧密结合，基本上不随前述洗脱液流动的氨基酸改变与树脂的亲和关系，又可使一些氨基酸洗脱和分离。如此进一步操作，即可使各类氨基酸分离开。

在有些条件下，可以改变溶剂的组成或组成比，使各类氨基酸得到进一步分离。例如氨基酸的乙内酰苯硫脲衍生物在硅胶柱上层析，可用 98:2 的氯仿和乙醇的混合液进行分离，虽然将脯氨酸分离得特别好，但对亮氨酸与异亮氨酸、缬氨酸与苯丙氨酸、色氨酸与甘氨酸等三对却分离不清，而谷氨酰胺、天冬酰胺、谷氨酸、天冬氨酸等未随溶剂流动，如果再以 88:2:10 的氯仿、乙醇和甲醇的混合液洗脱，可以得到进一步分离。

(3)测定每一种氨基酸的相对含量

通常，对于氨基酸是用氨基酸分析仪，通过与茚三酮反应生成有色产物来进行定量测定的。反应使每个氨基酸脱去一个氨基，生成一分子有色复合物(参见图 6-26)。因此生成有色产物的量与反应前所存在的氨基酸量成正比。上述操作过程的装置基本上可自动

化。如图6-26所示，装置内有一支离子交换柱，从其顶部加入降解后的产物，再泵入适当的洗脱缓冲液，当洗脱液流过柱而将洗脱的相应被分离的氨基酸带出时，它们分别与茚三酮溶液相混后通入加热的蛇形反应管，生成有色的茚三酮复合物，又分别进入比色池测定光吸收值，扫描在记录仪的纸带上。通常氨基酸分析仪先要进行已知相对含量的氨基酸标样的标定试验，测出各种氨基酸与茚三酮反应的产物"吸收峰"差异，得出各种氨基酸的实际量与所形成的有色复合物量之间的直接关系，从记录仪纸带上所展现的"峰"面积求得有色产物的量。然后将未知组分的蛋白质水解产物使用氨基酸分析仪测出各个吸收峰，以其相对峰面积推知所含各种氨基酸的相对组成比，要把氨基酸的相对比例换算为组成成分值，还需要知道蛋白质的相对分子质量，才能根据最小相对分子质量信息算得其组成成分。牛胰岛素等测得的氨基酸百分含量列于表6-7。

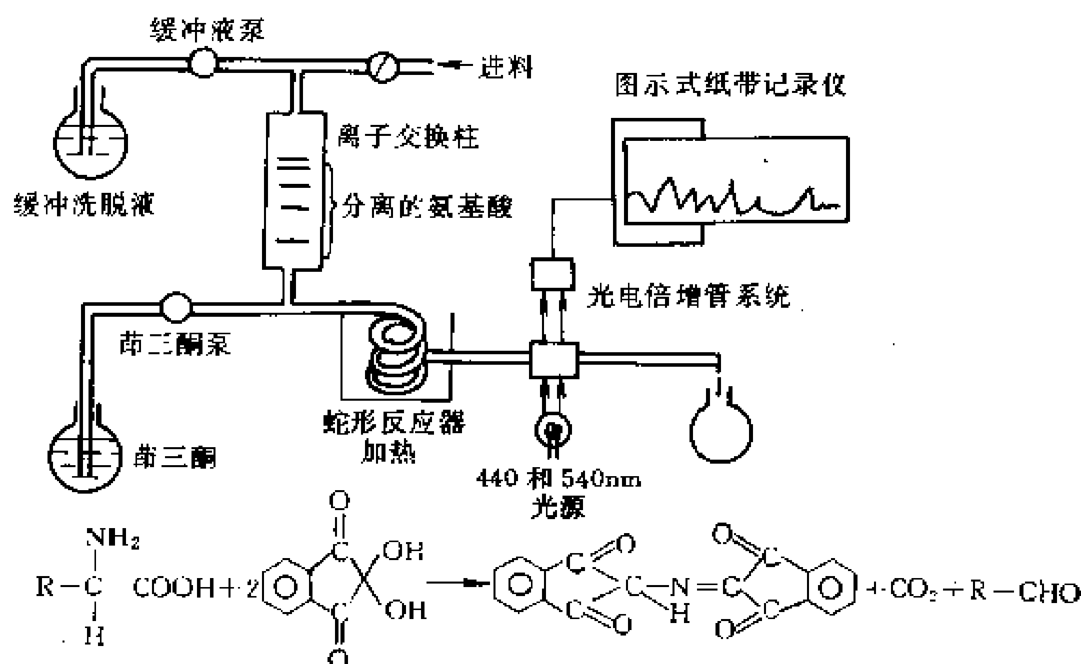


图6-26 氨基酸与茚三酮反应生成有色复合物及其测定装置

表 6-7　三种蛋白质的氨基酸百分含量

组　分	胰岛素(牛)	核糖核酸酶(牛)	细胞色素(马)
丙氨酸(Ala,A)	4.6	7.7	3.5
酰胺 NH_3	1.7	2.1	1.1
精氨酸(Arg,R)	3.1	4.9	2.7
天冬氨酸(Asp,D)	6.7	15.0	7.6
半胱氨酸(Cys,C)	0	0	1.7
胱氨酸	12.2	7.0	0
谷氨酸(Glu,E)	17.9	12.4	13.0
甘氨酸(Gly,G)	5.2	1.6	5.6
组氨酸(His,H)	5.4	4.2	3.4
异亮氨酸(Ile,I)	2.3	2.7	5.4
亮氨酸(Leu,L)	13.5	2.0	5.6
赖氨酸(Lys,K)	2.6	10.5	19.7
甲硫氨酸(Met,M)	0	4.0	2.1
苯丙氨酸(Phe,F)	8.6	3.5	4.5
脯氨酸(Pro,P)	2.1	3.9	3.3
丝氨酸(Ser,S)	5.3	11.4	0
苏氨酸(Thr,T)	2.0	8.9	8.4
色氨酸(Trp,W)	0	0	1.5
酪氨酸(Tyr,Y)	12.6	7.6	4.9
缬氨酸(Val,V)	9.7	7.5	2.4

括号中符号是各氨基酸代号

近年来,正在开发采用分离技术与成分分析联合的高效液相层析色谱法。

6.7.2　蛋白质一级结构(氨基酸顺序)测定

现在已经测定了数百种多肽和蛋白质的顺序,大多是采用F.Sanger实验室所建立的方法。研究结果表明,蛋白质最重要的性质首先取决于肽链内氨基酸顺序,所以测定蛋白质组成的氨基酸顺序对各种蛋白质在生命过程的性能研究是不可缺少的课题。概括地说,氨基酸顺序的测定基本上是从多肽链的某一末端(氨基末端或羧基末端)开始依次将氨基酸残基切下,并逐个进行鉴定。不过,实际上要按逐个氨基酸残基依次100%切下是困难的,每当末端残基逐步切下时,都会伴随着产生一些短的肽链产物,于是每一步中需特定分解到的产

物量在反应体系内所占比例依次减小,而从短肽链上切下的氨基酸,与前一些化学反应过程中尚未反应的较长肽链上所切下的氨基酸相混的机遇将不断地增加。为了解决此化学限制因素,使化学反应能够提供可靠的结果,应该先把多肽链降解成足够短的肽链,测定它们的顺序后再把这些结果拟合而组成整条多肽链的顺序。

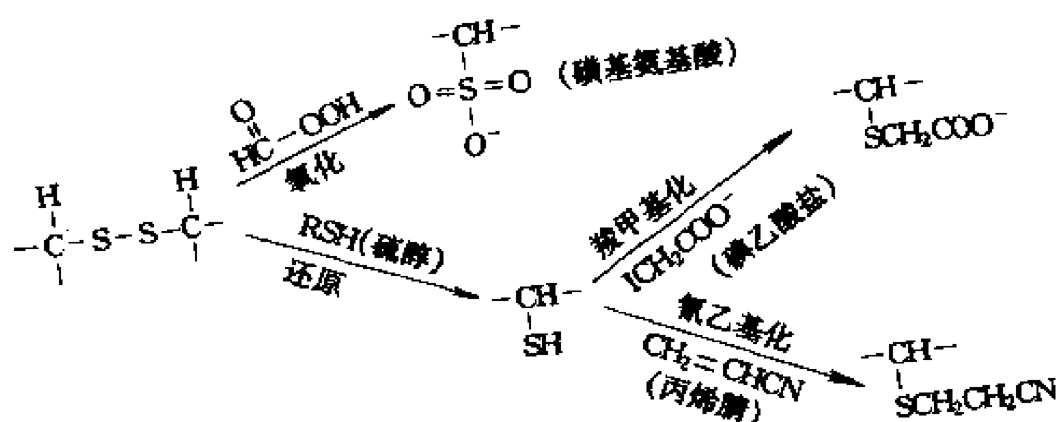
在蛋白质顺序测定中,实际所采取的步骤是:

(1)纯化待测顺序的蛋白质

将待测顺序的蛋白质进行纯化,一般是采用层析技术、超离心分离和电泳渗析等方法。

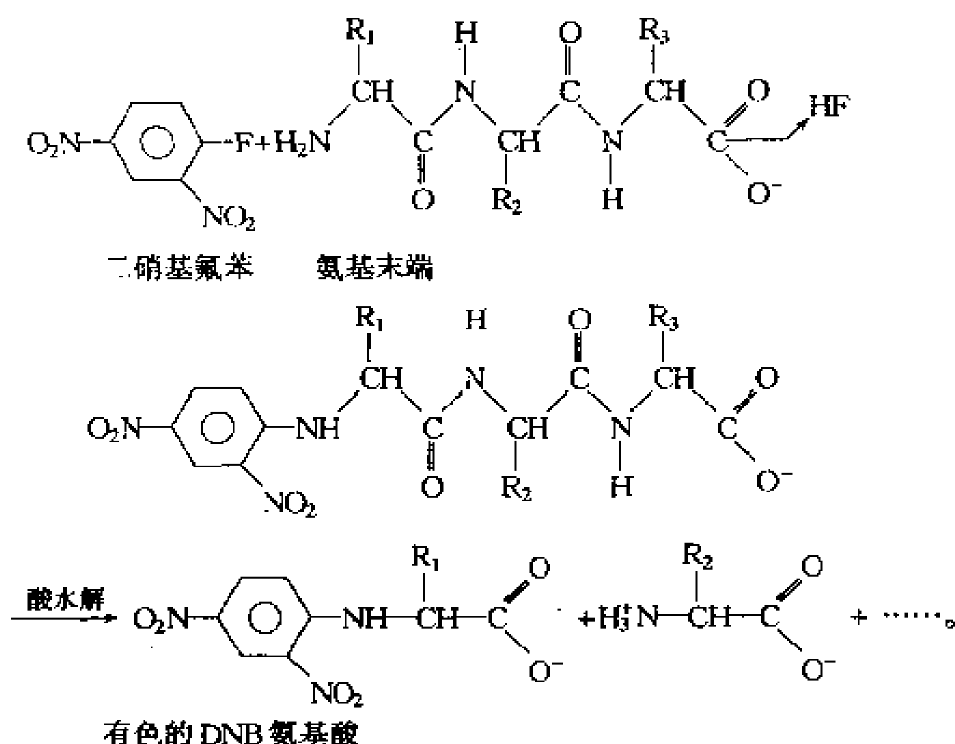
(2)拆开蛋白质中所有的二硫键

已纯化的蛋白质在测定其一级结构前,必须先拆开蛋白质的所有二硫键,这可用高甲酸对二硫键进行氧化,也可用硫醇对其还原,继而即刻与丙烯腈或碘乙酸进行氰乙基化或羧甲基化反应,以防止二硫键重新形成。上述裂解反应过程可表达如下:



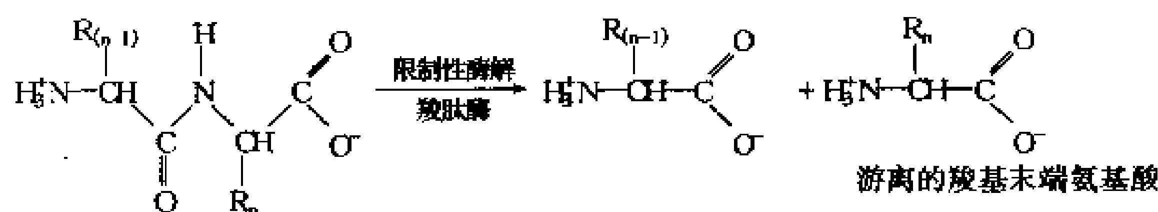
(3)测定多肽链的氨基末端氨基酸和羧基末端氨基酸

测定多肽链的氨基末端氨基酸可采用二硝基氟苯(FDNB)与之反应,然后进行水解,接上FDNB标记的氨基末端氨基酸(DNB-氨基酸)游离出来,呈现较深的黄颜色,继而根据它在薄层层析或纸上电泳中的迁移特性进行鉴定,其反应过程为



现广泛采用二甲氨萘磺酰氯(DNSCl)反应,产物是具有荧光的DNS－氨基酸。

测定羧基末端氨基酸的方法是将肽链在100℃条件下进行无水肼处理,羧基末端氨基酸仍以游离氨基酸形式存在之外,多肽链中其它所有的氨基酸残基逐个变为末端后均可逐步成为相应的氨基酸肼化物,于是可用层析法分离鉴定,而化学测定法至今还不能令人满意。还有一种方法是将肽链用羧肽酶进行限制性酶解。此蛋白质水解产物游离氨基酸中的主要成分是羧基末端氨基酸,依然可用层析法对其进行分离和鉴定。羧肽酶催化限制性酶解的反应如下:



(4)以不同的方法专一性地裂解多肽链

将多肽链降解成特定的短小片段而供顺序分析是用肽链内切酶催化反应,不同的内切酶可分别促使多肽链不同的特定位点上发生

分解反应。表 6-8 列举了通常用于内切的四种专一性酶。还有一种特有的化学方法是使多肽链与溴化氰进行反应,促使多肽链在甲硫氨酸残基处专一性地发生裂解,其反应如下:

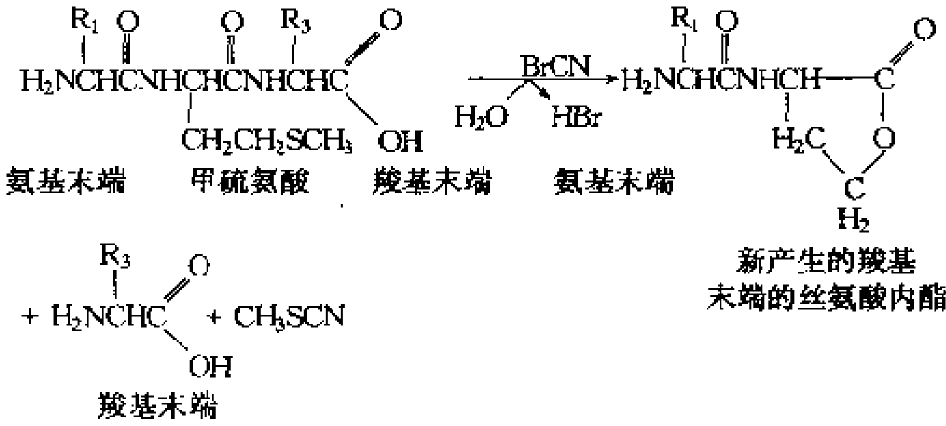


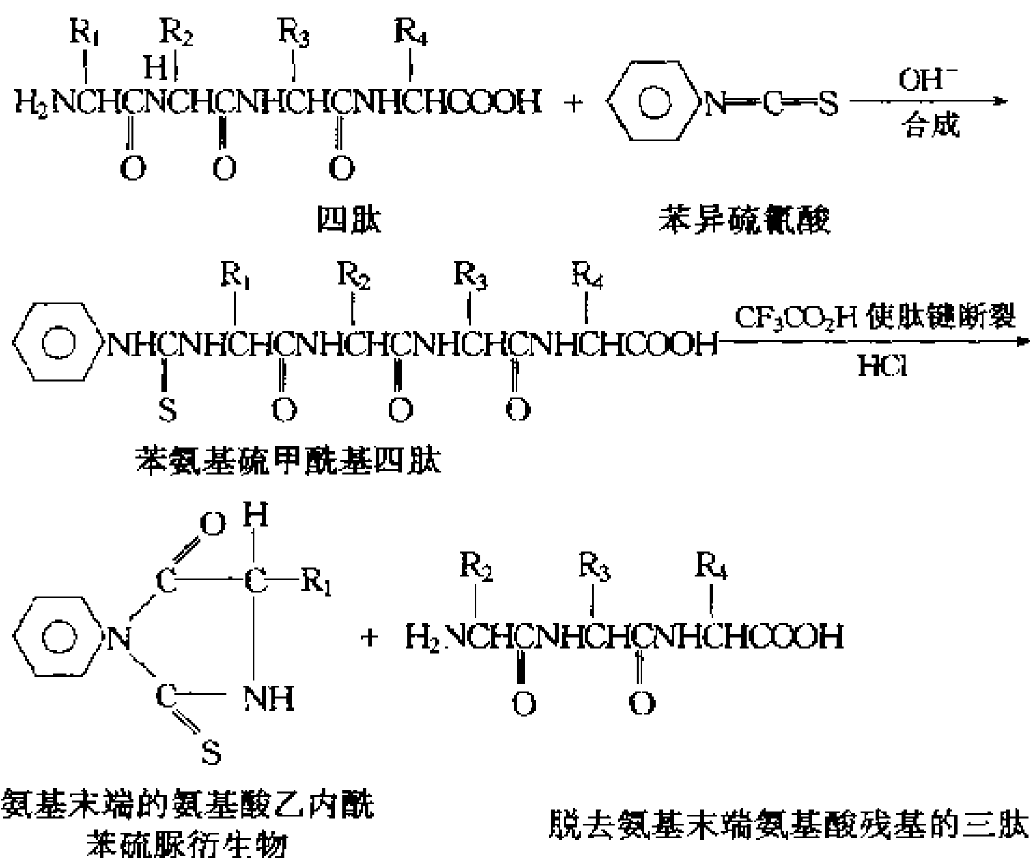
表 6-8 顺序测定中某些肽链内切酶作用位点

裂解位点	底物合适的侧链基团 R=	肽酶
$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-NH\overset{R'}{\overset{\|}{C}}H\overset{O}{\overset{\|}{C}}\vdots NH\overset{R}{\overset{\|}{C}}H\overset{O}{\overset{\|}{C}}-$	$-C_6H_5$ 或 $-C_6H_4-OH$ 苯丙氨酸(Phe)侧基　酪氨酸(Tyr)侧基	胃蛋白酶
$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-NH\overset{R}{\overset{\|}{C}}H\overset{O}{\overset{\|}{C}}\vdots NH\overset{R'}{\overset{\|}{C}}H-$	$H_3^+N(CH_2)_4-$ 或 $H_3^+N\overset{NH}{\overset{\|}{C}}-NH(CH_2)_3-$ 赖氨酸(Lys)侧基　精氨酸(Arg)侧基	胰蛋白酶
$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-NH\overset{R}{\overset{\|}{C}}H\overset{O}{\overset{\|}{C}}\vdots NH\overset{R'}{\overset{\|}{C}}H-$	$-C_6H_5$ 或 $-C_6H_4-OH$ 或 Phe 侧基　Tyr 侧基 (吲哚基)$-CH_2-$ Trp 侧基	胰凝乳蛋白酶
$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-NH\overset{R}{\overset{\|}{C}}H\overset{O}{\overset{\|}{C}}\vdots NH\overset{R'}{\overset{\|}{C}}H-$	$H_3^+N(CH_2)_4-$ 或 $(H_3C)_2CHCH_2-$ Lys 侧基　Leu 侧基 或 Arg 或 Gly 侧基	木瓜蛋白酶

同时又将羧基末端的甲硫氨酸转变为与20种天然氨基酸有所不同的高丝氨酸内酯,如将其进一步转变成高丝氨酸就容易鉴定了。

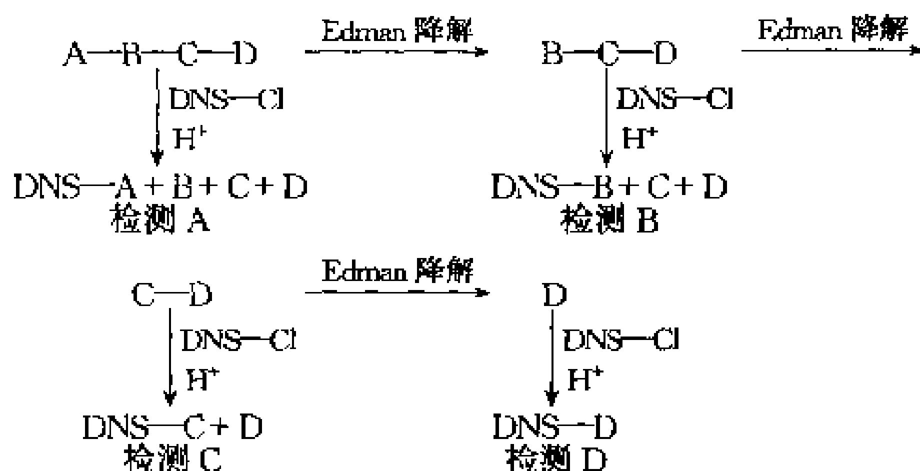
(5)测出分别分离以不同裂解方法产生的小肽链段各自的顺序

通常采用离子交换层析法,将完整蛋白质多肽链裂解的各类肽段分离之后,便可用不同的方法分析各类肽段的氨基酸组成及其顺序。若用Edman降解法,即将肽段氨基末端的氨基酸与苯异硫氰酸反应生成肽的苯氨基硫甲酰基衍生物,继而经盐酸的温和水解,氨基末端的氨基酸便以乙内酰苯硫脲的衍生物形式脱落下来。如此地操作,将肽段上的氨基酸从氨基末端起逐个切下,例如:



然后根据它们的薄层层析性质而进行鉴定(参见图6-27之例)。

另一种改进方法是"二甲氨萘磺酰氯-Edman降解法",在每步降解后,取出一小部分用二甲氨萘磺酰氯法进行相应的氨基末端氨基酸鉴定,其原理概括如下:



由于开创了肽段羧基末端氨基酸与玻璃珠共价连接的一种新技术，促进了 Edman 降解过程自动化而生产出测定顺序的装置——顺序分析仪。待测顺序的肽段与固定相的连接有利于彻底清除每步降解过程中可能形成的混杂物。

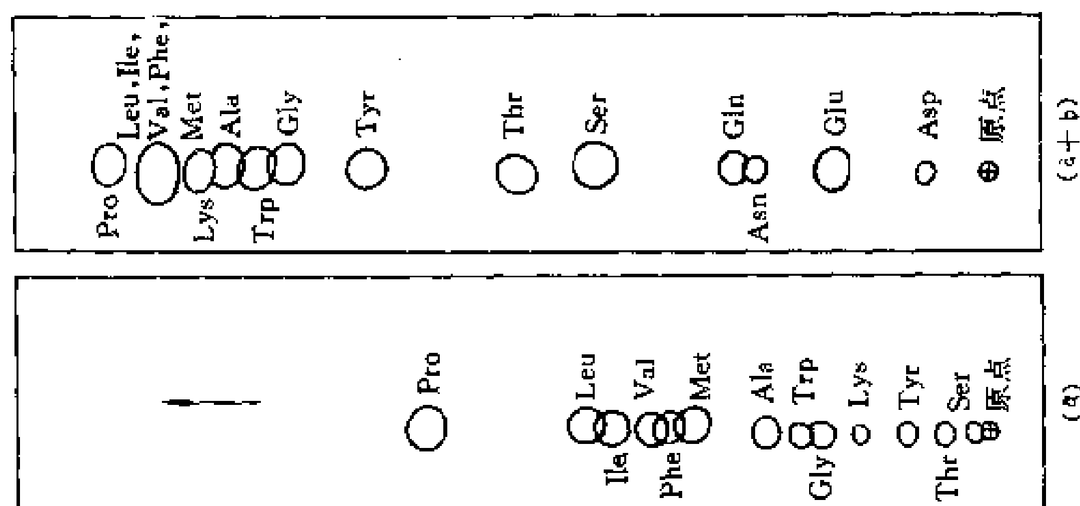


图 6-27　氨基酸的乙内酰苯硫脲衍生物在硅胶板上的层析图谱

(a)在 98:2 的氯仿和乙醇混合液中的分离情况；(a+b)是在(a)分离基础上，又在 88:2:10 的氯仿、乙醇和甲醇混合液中进一步层析分离

(6)以重叠方法将各肽段顺序组合成蛋白质多肽的完整顺序

对两种不同的专一性分解方法所得的两套肽段进行顺序分析，即可获得两套肽段的顺序，其中含有交叠顺序，也就是原先在完整的蛋白质多肽链内部连接一起的两个氨基酸残基，在第一种专一性分

解方法中，裂解成各个肽段时分裂形成了各自的游离羧基，而在第二种专一性分解方法所产生的肽段中仍连接在一起，出现在肽段顺序内部，不过也存在相反的情况。于是，便可在比较上述两种方法产生的肽段顺序分析所得的信息中确定该蛋白质多肽链的完整顺序。

例如，某蛋白质肽链的一个肽片段，用A种水解法得到四个小肽，它们分别被鉴定而推定为 A_1：Ala·Phe；A_2：Gly·Lys·Asn·Tyr；A_3：Arg·Tyr；A_4：His·Val。而水解法B所得到的三个小肽依次为 B_1：Ala·Phe·Gly·Lys；B_2：Asn·Tyr·Arg；B_3：Tyr·His·Val。现将它们重叠拼凑比较于表6-9中，可得到顺序排列的结论。

(7)确定完整蛋白质中二硫键的位置

要测蛋白质一级结构，完成顺序分析后，还需测定完整蛋白质中二硫键的位置，为此还要将未拆开二硫键的同一种蛋白质进行专一性酶解成肽链，经分离和鉴定，并与前述用化学法拆开二硫键的蛋白质酶解肽段相比较，便能发现一新肽段之存在，而拆开二硫键的酶解肽段中相应的两个肽段却消失了，即可确定二硫键的位置。这两种差别的比较方法，通常也用于检测已知顺序的蛋白质分子上的突变位点。

表6-9　肽段重叠比较法示例

肽　段	顺序重叠比较法
A_1	Ala·Phe
B_1	Ala·Phe·Gly·Lys
A_2	Gly·Lys·Asn·Tyr
B_2	Asn·Tyr·Arg
A_3	Arg·Tyr
B_3	Tyr·His·Val
A_4	His·Val
十肽段顺序	Ala·Phe·Gly·Lys·Asn·Tyr·Arg·Tyr·His·Val

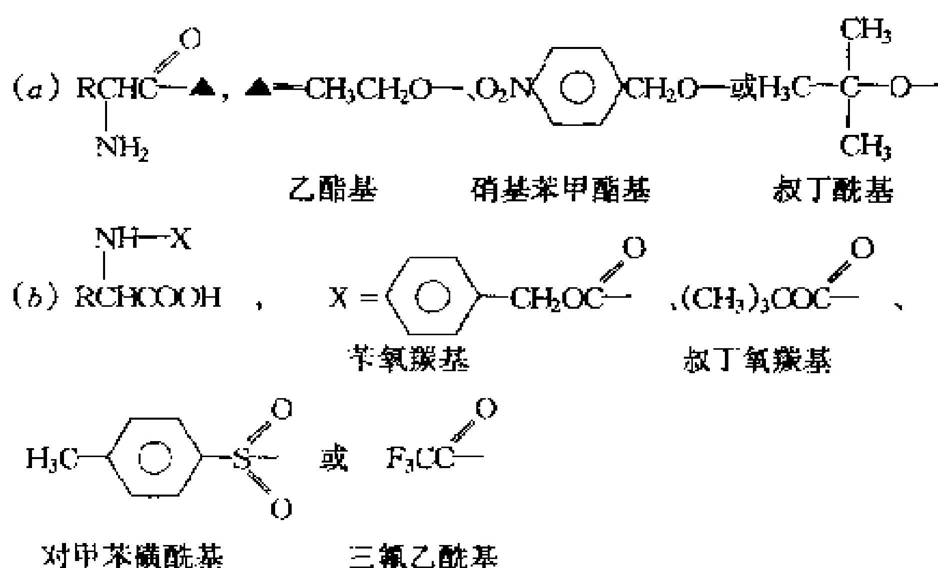
现在确定二硫键在肽链片段中位置的常用方法是“对角线电泳”，其大意是将肽链片段混合物依次在高甲酸氧化前后于pH 6.5

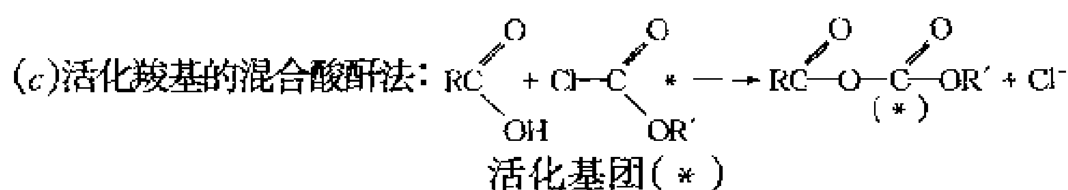
条件下进行两相电泳(即使用两对正负极垂直呈 x-y 轴),电泳实验中不含二硫键的片段泳向将分别分布于 x-y 轴交角的对角线上,包含胱氨酸的片段会泳离对角线。

在编码蛋白质的脱氧核糖核酸(DNA)顺序的测定方面也已取得颇大的进展,只要知道密码三联体即能在编码的 DNA 顺序上直接读出所求蛋白质的氨基酸顺序。在此类研究中发现了某些真核 DNA 编码蛋白质有不翻译的 DNA 插入顺序,而使其顺序成为不连续的,这就干扰了 DNA 顺序分析法在测定蛋白质一级结构中的应用。

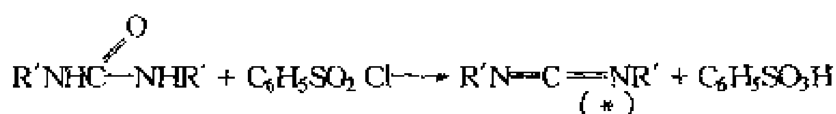
(8)研究蛋白质和多肽链的结构与功能的相互关系,以及合成已确定顺序的肽和蛋白质的方法,同时又可验证所测定的顺序之正确性。

肽的化学合成中需要阻止那些不应该反应的基团发生反应,因此,必须将不参加连接反应的氨基和羧基以及具有活性的侧链全部保护起来。(*a*)、(*b*)示出某些对羧基和氨基有保护作用的基团之例;连接反应结束后,通常还要将羧基进行活化,(*c*)示出了两种活化羧基的方法;如肽以生物合成,同时具有羧基活化过程。肽的合成完成之后,务必用温和方法将保护基团除去,(*d*)示出了保护、活化、连接以及去保护的全过程。

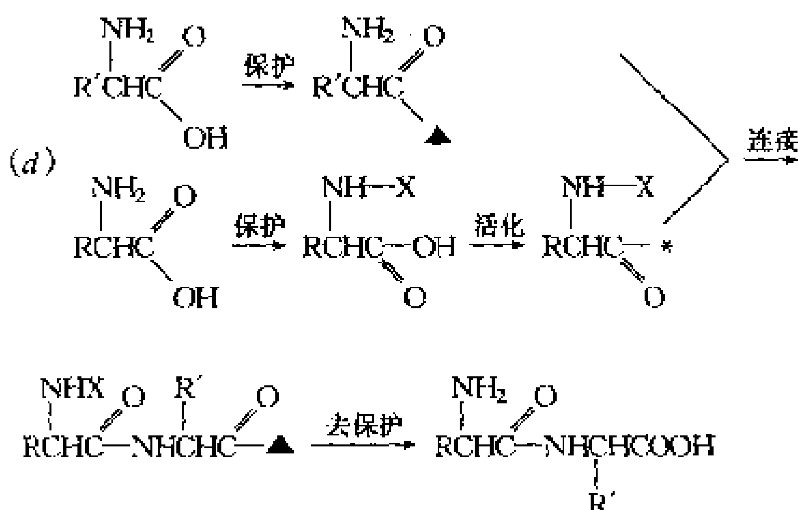




活化羧基的碳二亚胺法:



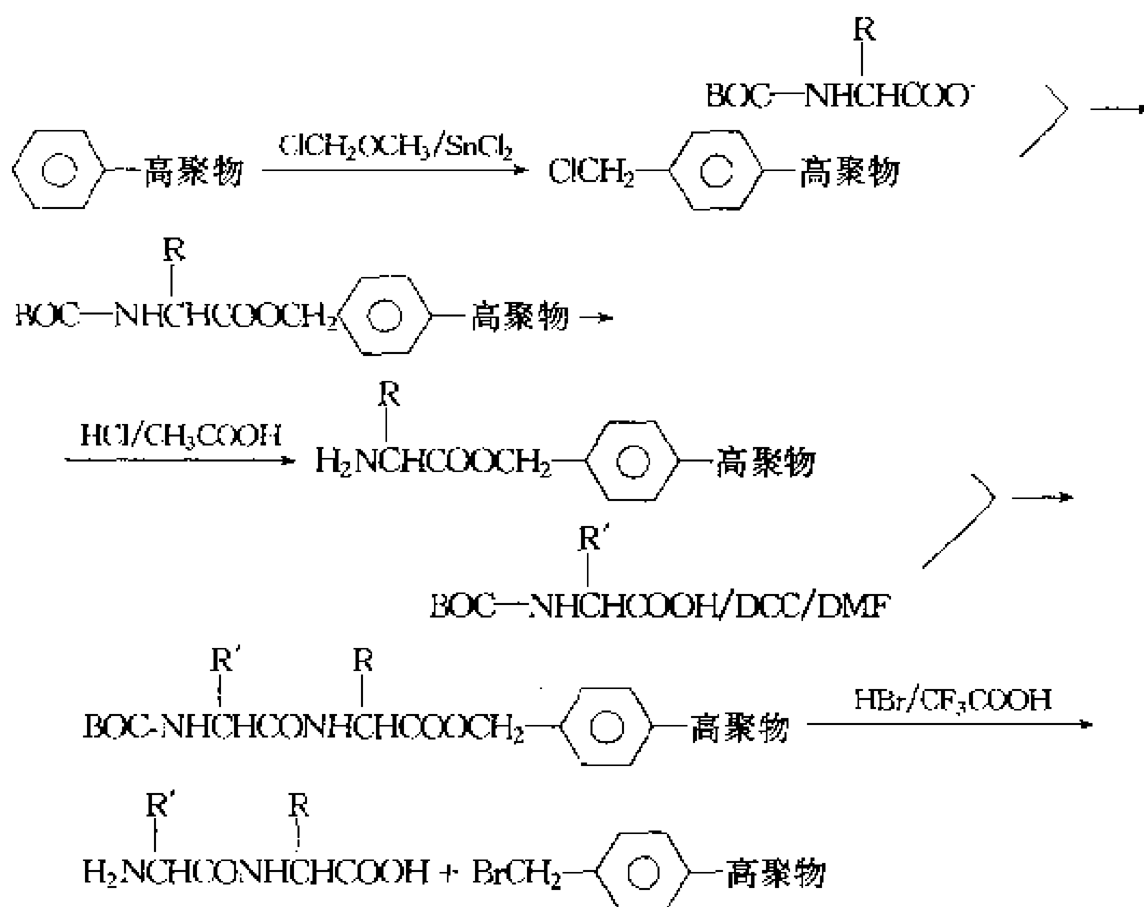




对肽常规合成的改良方法是:先把氨基上带有保护基团(叔丁氧羰基)的氨基酸连接到固相的聚苯乙烯树脂上,随后除去氨基上保护基团,让它与第二个氨基上带有保护基团的氨基酸连接,按此连续地进行,直到最后一步将合成完毕的肽链从树脂上切下。

由于上述每一步反应基本上都是定量的,多肽链或蛋白质均可应用以上方法,其优点在于能避免原先方法中各步骤所需的繁杂纯化过程及其造成的严重损失。李卓浩先生已应用这种方法合成了含有 39 个氨基酸的 ACTH(促肾上腺皮质激素)肽;Mertifield 也合成了牛胰核糖核酸酶。许多核糖核酸酶变种是在氨基酸顺序上有一个或多个残基的变化,这也能合成了。在我国上海的科学家于 1965 年 9 月取得了突破性进展,率先合成了具有生物活性的牛胰岛素,又在

1969年第一次人工合成了具有催化活性的牛胰核糖核酸酶(ribonuclease),并建立了自动控制的固相多肽合成仪。现将 Merrifield 高聚物固相合成法所合成的二肽之简略步骤示于如下:



反应式中BOC——代表叔丁氧羰基;

DCC——代表二环已基碳二亚胺;

DMF——代表二甲基甲酰胺。

6.8 光散射测试相对分子质量

6.8.1 光散射的基本概念

如有一波长远离任何吸收带之光照射溶液,其中分子可以极化,促使电子在分子内进行正弦振荡,于是在光的非入射方向上传播一些光能,形成了散射现象。现只考虑一个分子的散射作为讨论的基

础，见图 6-28。

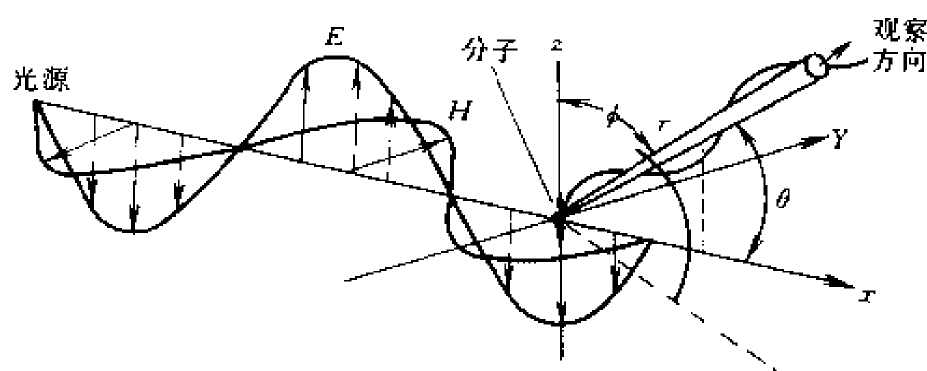


图 6-28 一个粒子的散射

（磁矢量垂直电矢量）

假定分子大小与入射光波长对比之下，可以看作点而位于坐标($x=0, y=0, z=0$)的原点上，沿 x 轴方向可用电场来描写，即在 x 处电场随时间 t 变化的电场强度为

$$E = E_o \cos 2\pi\nu\left(t - \frac{x}{c}\right) \qquad (6.8\text{-}1)$$

式中 E_o ——代表原入射光强度。

在分子($x=0$)处的电场随时间的变化为

$$E = E_o \cos 2\pi\nu t \qquad (6.8\text{-}2)$$

此场使分子极化而产生一个振荡偶极矩

$$\mu = \alpha E = \alpha E_o \cos 2\pi\nu t \qquad (6.8\text{-}3)$$

式中 α——代表分子极化率。〔α 的 SI 制是 $\alpha/4\pi\varepsilon_o$，E 的 SI 制是 $E(4\pi\varepsilon_o)^{1/2}$，$\mu$ 的 SI 制是 $\mu(4\pi\varepsilon_o)^{-1/2}$，$\varepsilon_o$ 为真空中介电常数 8.854×10^{-12}法/米〕

假定分子是各向同性的，偶极矩将在沿 z 轴的电矢量方向振荡，由此振荡偶极所产生的电场振幅（与此偶极距离 r、并与 z 轴偏振方向成 ϕ 角处）是

$$E_r = \left[\frac{\alpha E_o 4\pi^2 \sin\phi}{r\lambda^2}\right]\cos 2\pi\nu\left(t - \frac{r}{c}\right) \qquad (6.8\text{-}4)$$

式中 〔 〕内的项——代表散射波的振幅。

由振幅平方决定散射光强度 i(每平方厘米的能流),它与入射光的强度 I_o(正比于它振幅 E_o 平方)之比为

$$\frac{i}{I_o}=\frac{(\alpha E_o 4\pi^2 \sin\phi/r\lambda^2)^2}{E_o^2}=\frac{16\pi^4\alpha^2\sin^2\varphi}{r^2\lambda^4} \qquad (6.8\text{-}5)$$

此式表明,散射光强度随 r^{-2} 而减少,并随波长的减小而迅速增强,强度还与 ϕ 角方位的观察有关。在偶极振荡方向没有辐射。

通常在光散射实验中所用的光是非偏振的,i/I_o 公式可被推导而得

$$\frac{i}{I_o}=\frac{8\pi^4\alpha^2}{r^2\lambda^4}(1+\cos^2\theta) \qquad (6.8\text{-}6)$$

式中 θ——代表入射光束方向与观察方向间的夹角。

散射在前后方向上是对称的。公式描写了光被一个各向同性的小粒子散射,生物化学家研究溶液和利用光散射来测定溶质分子的一些性质(如相对分子质量等)时,需要大分子群散射时呈现的信息。

6.8.2 大分子溶液的瑞利散射和相对分子质量关系

倘若溶液是稀理想溶液,其中溶质行为呈现独立散射体,并假定粒子比波长小,在这种条件下的光散射称为瑞利散射。从(6.8-6)公式可知,每个粒子的光散射与其极化率有关,若将极化率与溶液对溶剂的折射指数的超量联系起来,在每立方厘米溶质粒子数 N 的情况下,可有如下公式:

$$n^2-n_o^2=(n-n_o)(n+n_o)=4\pi N\alpha \qquad (6.8\text{-}7)$$

式中 n ——代表溶液折射指数;

n_o ——代表溶剂折射指数;

α ——可看作溶质粒子的极化率对介入之溶剂分子极化率的超量。

将(6.8-7)式变换为如下的表达式:

$$\alpha=\frac{(n+n_o)(n-n_o)}{4\pi c}\,\frac{c}{N}=\frac{(n+n_o)(n-n_o)}{4\pi c}\,\frac{M}{L} \qquad (6.8\text{-}8)$$

式中 c ——代表以每立方厘米克数表示的浓度；

$\frac{n-n_o}{c}$——代表溶质的比折射指数增量；

L ——代表阿佛加德罗常数；

M ——代表溶质相对分子质量。

如果 n 与 c 有线性关系则可写成$\frac{dn}{dc}$，而 $c/N=\frac{M}{L}$，对于稀溶液 $n+n_o \simeq 2n_o$，于是

$$\alpha=\frac{n_o}{2\pi}(\frac{dn}{dc})\frac{M}{L} \tag{6.8-9}$$

将上式代入一个粒子光散射公式(6.8-6)而得

$$\frac{i}{I_o}=\frac{2\pi^2 n_o^2(dn/dc)^2 M^2}{\lambda^4 r^2 L^2}(1+\cos^2\theta) \tag{6.8-10}$$

如果每立方厘米有 N 个溶质粒子，$N=c\frac{L}{M}$，则 θ 角处的散射光强度 i_θ 为 i 的 N 倍，即

$$\frac{i_\theta}{I_o}=\frac{2\pi^2 n_o^2(dn/dc)^2}{\lambda^4 r^2 L}(1+\cos^2\theta)cM \tag{6.8-11}$$

上式说明，$\frac{i_\theta}{I_o}$值与 CM 乘积有关，也与观察处的 θ 角有关，这样，散射的前后向是不对称的。组合某些实验参数为瑞利比，此量 R_θ(瑞利比)定义为

$$R_\theta=\frac{i_\theta}{I_o}(\frac{r^2}{1+\cos^2\theta}) \tag{6.8-12}$$

于是

$$R_\theta=\frac{2\pi^2 n_o^2(dn/dc)^2}{L\lambda^4}cM=KcM \tag{6.8-13}$$

其中 $K=\frac{2\pi^2 n_o^2(dn/dc)^2}{L\lambda^4}$ (6.8-14)

此式展示，利用光散射的测量可确定溶质的相对分子质量。对非理想的真实溶液，测定相对分子质量散射公式要有修正项，即

$$\frac{Kc}{R_\theta}=\frac{1}{M}+2Bc+\cdots \tag{6.8-15}$$

式中　B——代表第二维里系数。

显然，务必在多个浓度上测得散射数据，并外推至 $c=0$，方能算得相对分子质量。

如果溶质相对分子质量是非均一的，从光散射法得到的是一质均相对分子质量。因为总的 R_θ 值必然是各不同相对分子质量的溶质组元的 $R_{\theta i}$ 之和，即

$$R_\theta=\sum_i R_{\theta i}=\sum_i Kc_iM_i=K\frac{\sum c_iM_i}{\sum c_i}c=K\overline{M}_w c \tag{6.8-16}$$

上式是在低浓度条件下所得的结果，其中还假定了所有组元的 K，也就是 dn/dc 均同，而 c 为总的重量浓度（$c=\sum c_i$）。于是可得出类同(6.8-15)形式的修正公式：

$$\frac{Kc}{R_\theta}=\frac{1}{\overline{M}_w}+2Bc+\cdots \tag{6.8-17}$$

测定相对分子质量时，必须在一些浓度下由实验参数（参见6.8-12公式）确定 R_θ，由 Kc/R_θ 对 c 作图外推至 $c=0$ 的截距中求得质均相对分子质量。测量光散射强度时一种光度计简介绘在图6-29中，散射到某一角度（例如90°）的光强度 i_θ 与入射光强度 I_o 相比较，散射中心与观察处距离可在仪器中作固定参数。计算相对分子质量尚需知道 dn/dc，稀溶液和溶剂之间的折射指数相差颇小，通常需要使用一种差示折射计以求得某 c 浓度的 dn/dc 值。由于杂质（例如灰尘）似极大分子那样会参与入实验数据中而导致严重的误差，所以溶液在使用前必须仔细地配制并过滤或离心，以保证溶液极其干净。

当散射粒子比入射光波长大时，各散射中心是在分子内部，可以说它们或多或少地彼此固定，于是分子内各偶极不同相地振荡，不能看作独立的散射体，必须考虑分子内这些散射中心之间对散射光的

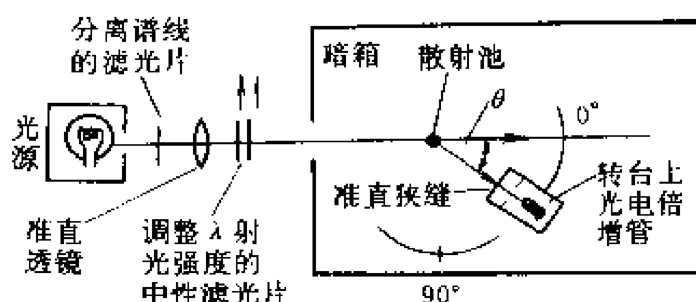


图6-29 光散射光度计简图

干涉，还要考虑分子的迅速布朗运动而具有一切可能的取向，所以情况颇为复杂。于是提出了可见光散射与观察角度 θ 和溶质浓度的近似关系式

$$\frac{Kc}{R_\theta}\approx\{1+\frac{16\pi^2R_G^2}{3\lambda^2}\sin^2\frac{\theta}{2}\}\{\frac{1}{\overline{M}_w}+2Bc\} \qquad (6.8\text{-}18)$$

式中 R_G——代表大分子粒子的回转半径。

在含有 N 个分子的溶液中可用分子内成对的质量单元间的距离来表示，即

$$R_G^2=\frac{1}{2N^2}\sum_{i=1}^{N}\sum_{j=1}^{N}R_{ij}^2 \qquad (6.8\text{-}19)$$

由(6.8-18)式可知，$\frac{Kc}{R_\theta}$与观察角度与溶质浓度均有关。除了$\frac{Kc}{R_\theta}$纵坐标之外，尚需两个坐标(角度和浓度)，让角度和浓度都外推至零才能得到 $\overline{M}_w$。齐姆(B.H.Zimm)推荐了同一张图上进行两种外推到零的方法，图 6-30 示出大分子光散射数据的齐姆图之例，这是纵坐标 Kc/R_θ 对横坐标($\sin^2\theta/2+kc$)所绘之图，其中的 k 是任意常数，此图取 k＝2000，可得到一较方便的比例尺，每次对一特定的 θ 和 c 值，可以测定一 R_θ 数据，例如先固定某一浓度测定不同的 θ 角度之一系列点(如线 A)，作成线 A，在此浓度下于零角度得到一 Kc/R_0 点(即图上 X_A 点)。在每一浓度下都可测得如此之点，便能获得 0° 时不同浓度下的一条线，它代表 DNA 样品在各种浓度和零角度上的

一系列数据，即

$$(\frac{Kc}{R_\theta})_{\theta=0}=\frac{1}{\overline{M}_w}+2Bc \quad (6.8\text{-}20)$$

这条线外推至 $c=0$ 时，从纵坐标 $(\frac{Kc}{R_\theta})$ 上的截点可得 $\overline{M}_w$ 即质均相对分子质量，并由此线斜率求得 B。

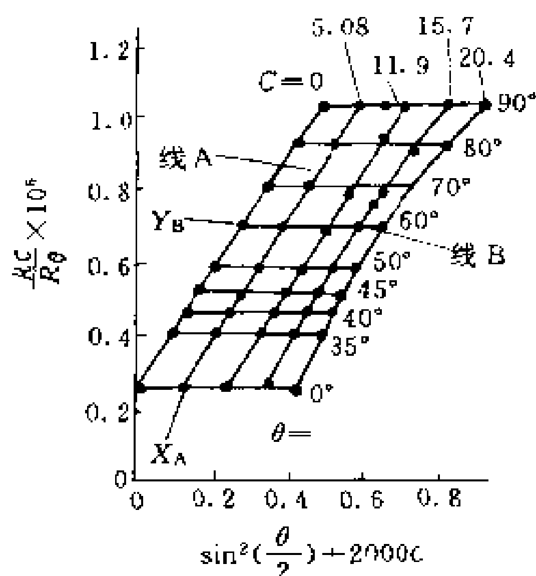


图 6-30　DNA 的光散射齐姆图

上标数指浓度，右标数指角度

如果选择某散射角测量不同浓度的散射光强度，获得一系列点组成的线 B，外推至 $c=0$ 处的点 Y_B，这是给定 θ 条件下 $c\to0$ 时的 Kc/R_θ 趋近值，在一系列观察角 θ 所得到之 $c\to0$ 时的 Kc/R_θ 趋近值与 θ 角的关系式为

$$|\frac{Kc}{R_\theta}|_{c\to0}=\frac{1}{\overline{M}_w}\{1+\frac{16\pi^2}{3}\frac{R_G^2}{\lambda^2}\sin^2\frac{\theta}{2}\} \quad (6.8\text{-}21)$$

由此式作线的截点可检验 $\overline{M}_w$，其斜率可得 R_G 信息。

从(6.8-21)式可见，R_G 是一个有关粒子大小和形状的信息量(见表 6-10 各种形状的 R_G 和粒子大小的关系)。综上所述，表明光散射也是一种确定粒子重量和大小的方法。由于小分子的散射能力低和极大的大分子之复杂性，使光散射方法的应用受到了限制，实验中因光的衍射效应而难在小于 5°散射角情况下测量。

表 6-10　各种形状粒子的 R_G 和大小间的关系

形　状	R_G	大小的符号
球	$\sqrt{3/5}R$	R＝球半径
长圆椭球	$\sqrt{2+\gamma^{-2}/5}a$	轴为 2a、2a、γ2a(γ 为倍数)
极长棒	$L/\sqrt{12}$	L＝棒长
无规线团	$(\overline{h^2})^{1/2}/\sqrt{b}$	$\overline{h^2}$＝均方端间距

6.8.3 小角 X-射线散射

由可见光散射的角关系来测量 R_G 小于约 10nm 的粒子相对分子质量时，上述方法不能使用了。因为以上方法的分辨能力与$(R_G/\lambda)^2$ 有关。例如，蛋白质与核酸若用约低于 300nm(或毫微米)辐射波即开始有非常强烈地吸收，而稍低于 200nm(纳米)处水和空气等几乎每种物质均很强烈地吸收，只有达到 X 射线波长条件下方能在颇小的角度上进行散射测量，也才允许外推到 $c=0$(零角散射)来计算相对分子质量。通常使用的 X-光为 Cu-α 辐射(波长 0.154nm)，而核糖核酸相对分子质量为 13683)的横间距是 10 倍 λ 数量级，散射几乎完全局限在一很窄的角度范围内。

使用 X-射线的散射方法，情况则不一样了。根据经典理论，单个电子的 X-射线在 θ 角处散射强度 $i_e(\theta)$ 为

$$i_e(\theta)=\frac{I_o}{r^2}\left(\frac{e^2}{mc^2}\right)^2\left(\frac{1+\cos^2\theta}{2}\right) \tag{6.8-22}$$

式中 e ——代表电子电荷；

m——代表电子质量；

c ——代表光速。

对于一个含有 n 个电子的分子，每立方厘米有 N 个分子的 1 立方厘米溶液的散射强度(相加性)为(以 θ 为零度来表达)

$$i(o)=\frac{I_o}{r^2}\left(\frac{e^2}{mc^2}\right)^2 n^2 N \tag{6.8-23}$$

研究溶液中的分子散射，若用 $n-n_o$ 代替 n，即溶质分子超过它所置换的溶液体积之电子数，并以$(n-n_o/M)$表示之，因

$$N=Lc/M$$

式中 M ——代表质均摩尔质量($\overline{M}_w$)；

c ——代表重量浓度。

实际上，$(n-n_o)/M$ 是与化学组成有关，可视为原子数与相对原子质量之比，于是公式可转写成

$$i(o)=\frac{I_o}{r^2}\left(\frac{e^2}{mc^2}\right)^2 L\left(\frac{n-n_o}{M}\right)^2 Mc \tag{6.8-24}$$

由 i(o)对 c 作图外推至 c=0,才可在斜率中计算 $\overline{M}_w$。

从极小角度里的 i(θ)与散射角关系中可求出回转半径 R_G,不过,考虑到伸展了的粒子,习惯上,要将公式稍作改动,以 P(θ)〔实际上还是 i(θ)〕与 θ 关系式作图求出,P(θ)是在 θ 角方向上的散射强度 i(θ),与粒子具有同样的相对分子质量以及相同的散射偶极,但大小与 λ 相比是无穷小(即紧密粒子)时所观察到的散射强度之比。任何粒子 P(θ)与 θ 关系式可导出为

$$\ln P(\theta) = -\frac{16\pi^4 R_G^2 \sin^2\theta/2}{3\lambda^2} \tag{6.8-25}$$

式中 R_G——代表粒子大小。

也就是说,ln i(θ)对 $\sin^2\theta/2$ 作图可得一条截于 ln i(0)和斜率为 $-16\pi^4R_G^2/3\lambda^2$ 的直线,由此得出 R_G。表 6-11 给出了由散射方法得到的某些物质的相对分子质量与粒子大小。

表 6-11 光散射和小角 X-射线

样　　品	$\overline{M}_w$	R_G(nm)
溶菌酶*	<u>14100</u>	1.52
β-乳球蛋白*	36000 <u>36700</u>	<u>2.17</u>
血清白蛋白*	70000	<u>2.98</u>
肌球蛋白	493000	46.8
DNA	4×10^6	117.0
烟草花叶病毒	39×10^6	92.4
萝卜黄花叶病毒*		<u>10.4</u>
		〔埃(Å)=0.1nm〕

* 有划线的值是由小角 X 射线散射得出

虽然散射方法还不能得出粒子形态大小的详细细节,不过还是能提供确定像长形粒子的截面积和单位长度的质量等信息。

6.9 X-射线衍射法

X-射线衍射对生物化学领域中有关物质,例如球状蛋白质等大

分子晶体结构的研究，取得了突破性进展后，从大分子晶体的网孔和分子编织中获得了有用的信息，现已成为研究生物化学中蛋白质链的所有残基在空间位置和酶活性部位的有力工具。近年来所得到的关于蛋白质催化活性和其它功能活性的许多知识，都是从了解蛋白质的三级结构中得到的。有关结构上的信息已对现代生物化学产生了巨大的影响。但X-射线衍射毕竟是一种复杂和困难的物理技术，在此只能作一般性地介绍，想深入掌握者尚需阅读有关专著。

6.9.1 X-射线衍射的基础知识

倘若晶体被描绘成一组均匀相间的反射面，X-射线以 θ 角入射在这些反射面上，并以 θ 角反射时，角 θ 必需满足布雷格定律的条件才会使反射波增强，即

$$2d\sin\theta = n\lambda \tag{6.9-1}$$

这里 n 是整数，只有当相间的两反射平面使光速的路程差（见图 6-31）是波长 λ 的整数倍时才会增强反射光束。对于含有许多原子排列平行面的很大而完整的晶体，在一切不严格满足此条件的角度上，反射光将彼此产生相消的干涉。

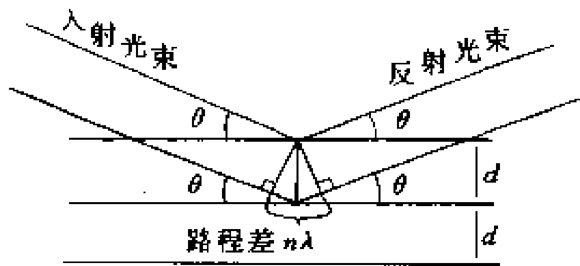


图 6-31 布雷格方程图介

为了理解 X-射线衍射，可参比可见光光学显微镜的原理。来自点光源的可见光投射到所要测试的物体上，当光波遭遇物体后，便从物体上散射出来，物体的每一部分成了新光源，不过散射光波已包含了有关物体结构的全部信息。如用透镜把散射光波收集起来，并加以重新组合起来即形成了一幅物体的放大图像（参见图 6-32）。可是蛋白质尽管称为相对分子

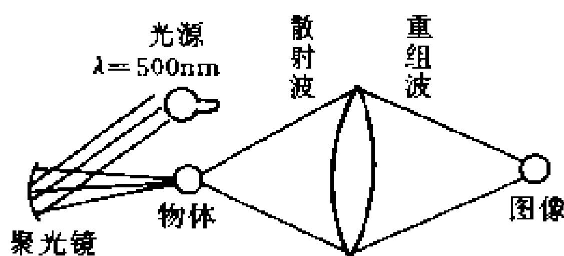


图 6-32 光学显微镜

质量很大的大分子，但它的大小对比可见光波长依然是很小的。任何成像系统需要获得清晰度或所谓的分辨率，均取决于投射到物体上的入射光波长，即所需分辨率等于二分之一入射光波长($\lambda/2$)。可见光的 λ 在 400～700nm，显然可见光显微镜是不能分辨分子中原子排布结构细节的。金属原子被激发所发出的 X-射线，其波长在 0.1nm～零点几个 nm 范围内，相当于原子间距，可以达到分辨率的要求。这种波长范围的光，能从蛋白质分子三维周期性有序排列所组成的单晶获得有利于分析的重组图像。

X-射线衍射是一种散射现象，如果波长与晶体结构的周期性间隔相比拟时，散射光在晶体内部干涉和增强都有可能。假设最简单的周期性结构是一列均匀相间隔的一维散射中心，受到垂直于原子列方向的入射 X-射线的照射，产生了衍射(参见图 6-33)，这些散射

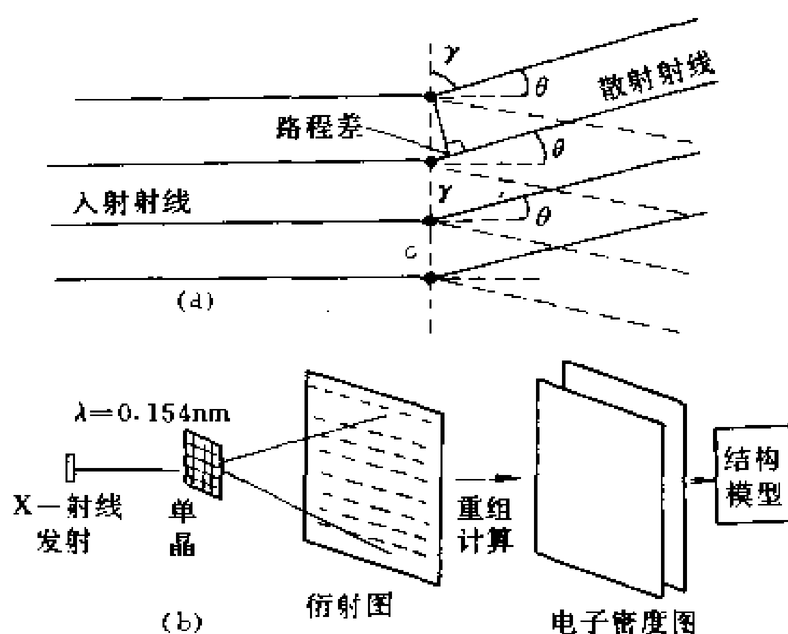


图 6-33

(a)一列散射中心的衍射(因 γ 角使路程差 = 1λ 时增强)　(b)X-射线单晶衍射的成像过程

中心将在所有方向上散射，某些方向上会出现散射射线的增强，但这

只能是符合相邻原子散射射线间路程差相当于波长的整数倍条件时才发生，即

$$l\lambda = c\cos\gamma \qquad (6.9\text{-}2)$$

式中 l——代表一个整数。

若原子列非常长，则在所有其它角度上衍射因干涉而将完全湮灭。于是，由一列原子(一维散射中心)所散射的射线只沿圆锥面散射，并与垂直于入射射线方向的照相底板(或屏幕)相截，将呈现双曲线形的层线于底板上(图 6-34)。然这些底板上的层线的间隔趋于与 $\cos\gamma$ 成正比，则也就正比于 $1/c$。因此，晶体中心的间隔与衍射图形上的间隔形成倒易空间关系，即晶体中间隔较小则在衍射图形上呈现间隔较大，反过来，晶体中较大的间隔却在衍射图形中反映成间隔较小。

6.9.2 封·劳厄方程

如果入射射线与散射体列形成 γ_o 角而不是 90°，那么，公式(6.9-2)便要修改成

$$l\lambda = c(\cos\gamma - \cos\gamma_o) \qquad (6.9\text{-}3)$$

对于在 x 和 z 方向上间隔分别为 a 和 c 的二维阵列，则必须同时满足两个方程：

$$h\lambda = a(\cos\alpha - \cos\alpha_o) \qquad (6.9\text{-}4)$$

$$l\lambda = c(\cos\gamma - \cos\gamma_o) \qquad (6.9\text{-}3)$$

按照上述两公式的条件，只有沿着 x 列散射中心衍射的圆锥与 z 列散射中心衍射的圆锥相截的线才发生增强〔见图 6-33(b)〕，处在平行于二维阵列位置的照相底板上将出现斑点。

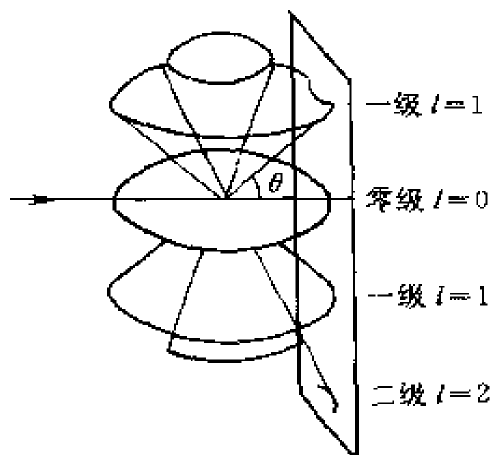


图 6-34 一列散射体的衍射圆锥

如果使用 x、y 和 z 方向上的

间隔分别是 a、b 和 c 的三维阵列晶体(例如斜方晶体),则除了需要满足上述(6.9-3)和(6.9-4)两公式外,尚须满足第三个方程,即

$$k\lambda = b(\cos\beta - \cos\beta_0) \qquad (6.9\text{-}5)$$

以上的(6.9-3)、(6.9-4)和(6.9-5)三个方程通称为封·劳厄方程。根据几何和三角的关系可以得出

$$\lambda\left(\frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2}\right)^{1/2} = 2\sin\theta \qquad (6.9\text{-}6)$$

括号中的表达式一般表示具有密勒指数为 h、k、l 的平面之间距离的倒数。如不是斜方晶体相当于(6.9-6)的表达式那就更复杂些。

对于任何取向的晶体,不可能同时满足封·劳厄方程,只有当晶体相对于入射射束取某种取向时才会发生增强作用。例如平行于 z 和 y 轴而垂直于 x 轴的 100(代表密勒指数 hkl,见图 6-35)平面,在与入射 X-光束方向成某 θ 角时才可能有来自该平面的衍射,此角必须满足这组平面的 $\frac{h\lambda}{a} = 2\sin\theta$ 条件。垂直于 y 轴的 010 平面如能满足 $k\lambda/b = 2\sin\theta$ 条件,则在照相底板上也就会出现相应的斑点。

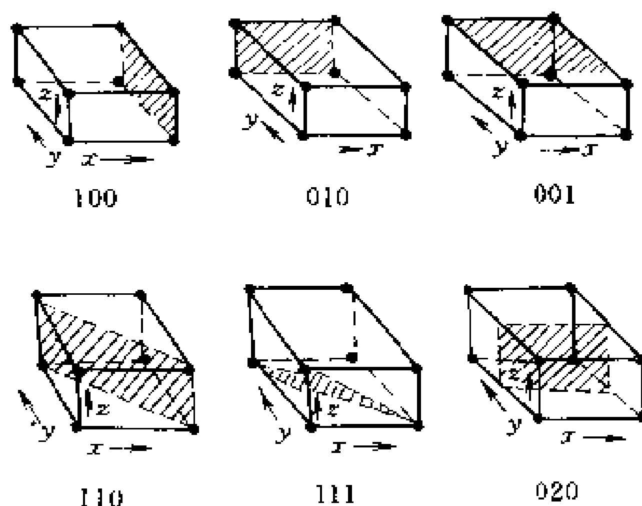


图 6-35　边长为 a、b、c 的斜方单晶可能有的密勒指数平面

按倒易空间概念,如平面截轴于 a/h、b/k、c/l,则该平面的密勒指数为 h、k、l

现在实验技术的发展,人们可以利用计算机将晶体在各个方向

上散射波重组，汇集衍射图以再现蛋白质分子的三维图像及有关信息数据。

6.9.3 X-射线衍射的实验技术及其在蛋白质分析方面的应用

首先要制取适合于X-射线研究的蛋白质晶体，可以采用多种方法，其重要目的在于创造一种环境使分子以特定方式相互连接成为三维有序排列。一般用溶剂微扰法使蛋白质在结构完整的状态下析出。用于X-射线衍射研究的典型蛋白质晶体大约含有10^{12}个蛋白质分子，沿每一晶棱排列约有10^4个分子，使边长为0.5mm左右。为使结晶蛋白质处在一种与自由溶液无实质性差别的环境中，则需蛋白质晶体含有20%至70%体积的溶剂。

供蛋白质晶体研究用的X-射线，通常是由高压(~50kV)电子轰击铜靶所产生的特征性铜X-射线，$\lambda=0.154$nm。

为了能使样品取向按布雷格条件获得衍射图形，常用方法是旋转晶体法，或者用一种由许多小而取向无规则晶体组成的粉末法，不过粉末法衍射图虽也能反映晶格间隔，但不像单晶照相那样容易识别。

关于蛋白质晶体的X-射线衍射图是由不同强度的有规则感光点所组成，参见图6-36蛋白质晶体X-射线衍射示意图。由于晶体重复单元的散射波相消干涉，产生了一系列有规则的斑点。该衍射图所示意的晶体，其重复单元(或晶胞)含有4个对称排列的蛋白质分子，所以该晶体衍射图中斑点强度也显出相应的对称形态。根据衍射斑点间距离与晶体重复单元(即晶体的最小组成部分，通称晶胞)的实际尺寸成反比关系，可以推知晶胞的尺寸及其连续重复的分子排列堆积的整个结构情况。衍射斑点强度的大小还包含有关蛋白质详细结构的信息。这可用照片黑度计或闪烁计数器对每个斑点扫描检测，并收集所有斑点的强度数据进行计算晶体的电子密度图，从而再现蛋白质的结构。使用不同等级的分辨率来计算将导致精细结构的呈现水平有很大的不同。靠近原点的衍射强度数据反映的是分辨力较低的分子大范围结构形态，而靠近边缘的那些数据才是对应于

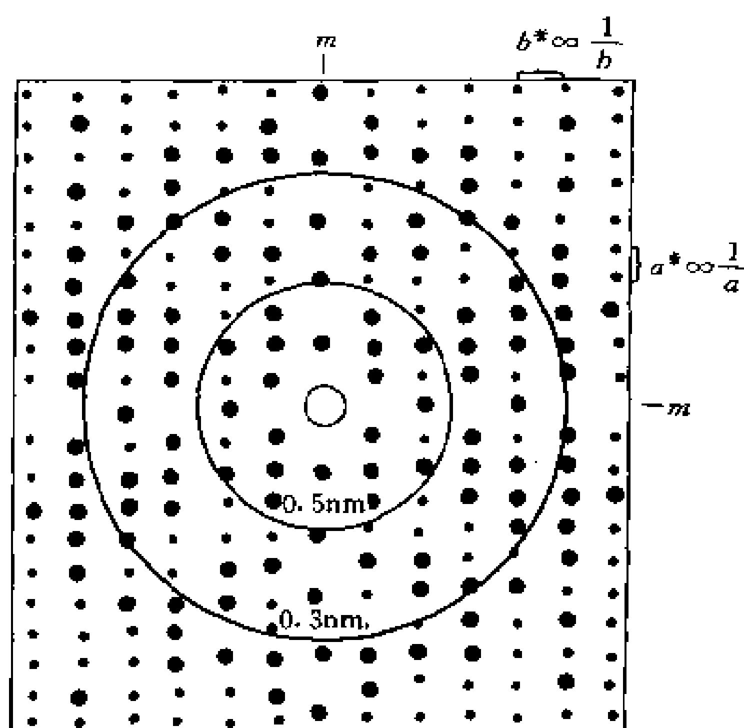


图 6-36　X-射线晶体衍射示意图

斑点间的距离与晶体的晶胞尺寸成反比，斑点对称性(见两镜面)与斑点沿镜轴间隔性出现以及斑点强度和离中心远近含有分子结构有关的信息

较精细结构形态的。

纤维的 X-射线衍射的情况介于单晶和粉末法之间，纤维结构在垂直于纤维轴的方向上或多或少都有些规则性，在沿纤维轴方向也可能有某种规则性。因为有些生物聚合物从溶液中抽出丝时就会产生某些取向的晶体部分，而纤维中各种取向程度不同的晶体，在衍射图形上会表现出环状、弧状或斑点状，图 6-37 是丝纤蛋白的 β 结构所呈现的衍射图形。在纤维轴的垂直线(所谓子午线)上 0.35nm 处有一反射感光图形，这 0.35nm 相当于氨基酸的重复距离。在 0.7nm 处相当于两个残基重复距离的高度上也可看到感光图形。在赤道线上的反射图形相当于不同方向的链间间隔。

图 6-38 为 DNA 衍射图形，其特征是从原点出发呈对角线斑点

行列，这是典型的螺旋形纤维状样品的衍射图形。“X”图形与赤道平面所成的角非常接近螺旋的倾斜角，斑点离赤道平面的垂直距离的倒数相当于沿螺旋轴的重复距离。由此衍射图形会提供螺旋结构细节的信息。

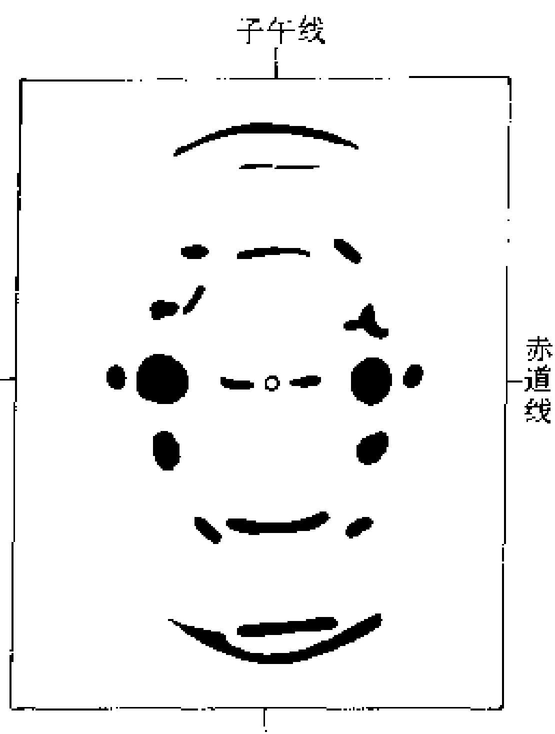


图 6-37　丝纤蛋白 β 结构的纤维衍射示意

对于那些链的结构以复杂方式盘绕和折叠起来的像细胞色素这样的酶分子，并不具有简单重复的三维结构，因而为了推定详细结构必须利用衍射照相中具有的尽可能多的信息，即不只是计算斑点的间隔，还要检测斑点强度，这将涉及来自单胞中不同相位，散射能力不同的中心（即原子）所反射出许多振幅不同的波而提供的贡献。所以还要采取一些复杂的措施，例如测量重原子同晶型置换后的蛋白质晶体衍射图形，与天然的蛋白质衍射图形比较，并测量这些衍射图形包括斑点强度，推算重原子的位置及这些反射中心的

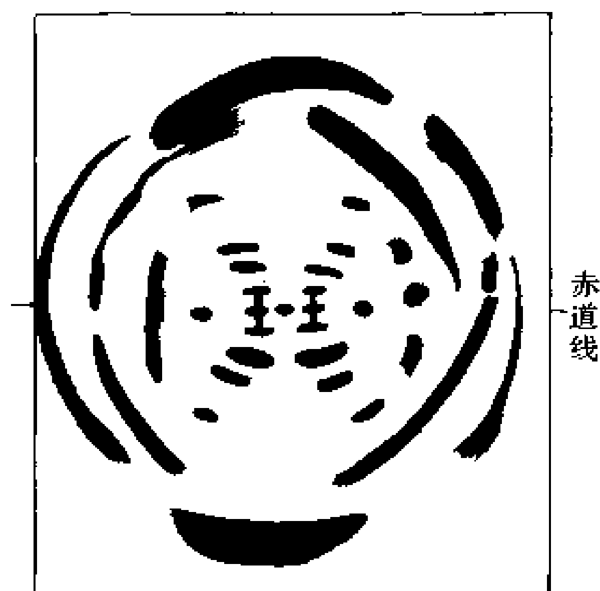


图 6-38　湿 DNA 纤维的 X-射线衍射示意

反射相位，然后通过富氏级数去获得试验性的电子密度分布图，它可由下式表示：

$$\rho_{(xyz)} = \frac{1}{V}\sum_{h}\sum_{k}\sum_{l}F(hkl)e^{-2\pi i[(hx/a)+(ky/b)+(lz/c)]+\alpha_{(hkl)}}$$

式中 V ——代表单胞体积；

$F(hkl)$——代表 hkl 表面层的振幅，称为结构因子；

$\alpha(hkl)$——代表 F(hkl)的相位角。

再进一步利用此图使计算精确化，从而可结合蛋白质的一级结构(顺序排列水平)，确定蛋白质的高级(二级、三级等)结构。

如果一旦测试出蛋白质的天然结构，就能将各种不同的辅助因子或底物类似物结合到晶体内的分子上去，便可从衍射斑点的强度计算出新电子密度图而探明天然蛋白质与其辅助因子或底物分子间相互作用情况，可为了解蛋白质的许多催化性质和其它功能性质提供主要基础。

以上仅介绍了在生物学和生物化学研究领域中所使用的一些技术和方法，在世界科学技术不断迅速地发展的今天，随着科学技术的进步，将会开拓更多的科技方法，应用于生物学与生物化学领域的研究。

结 束 语

生物物理化学是一门理论与研究方法密集的科学。要揭开生物过程的奥秘，并对其进行解释，不仅需要理论，而且也需要研究方法，于是本章介绍和阐述了分子生物学中较常用的各种物理化学研究方法和技术。科技工作者必须通过各种可能的手段(包括标记方法)对有关生物过程进行测试，并以测试结果为依据，从中获得信息，才能探索其机制，从而提高到理论认识。人们一旦掌握了生命过程的分子生物学理论，就能对人类的健康事业作出更多的贡献。

第七章　蛋白质的结构与一般性质

所有生物最基本的分子基础是蛋白质与核酸两类生命大分子，它们形成高级的生命活动物质，必须通过电子显微镜和 X 射线衍射分析技术等，方能分辨与功能密切有关的高级结构。本章着重地讨论了蛋白质的结构与一般性质。

7.1　蛋白质的一级结构

7.1.1　蛋白质的构建简介

蛋白质是细胞内含量最高的组分，酶、抗体、多肽激素、输送媒介等都是由蛋白质构成的。蛋白质是在结构与功能上种类最多的一类分子，它们活跃于一切生命体系中起着关键的作用，天然蛋白质的水解终产物已发现有 20 多种不同侧链（即 R 基）的氨基酸（名称见表 2-4 和表 2-5），说明组成蛋白质的基本分子单位是氨基酸，每个氨基酸通过它们的酰胺键（ $-\underset{|}{\overset{|}{C}}-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-\overset{\overset{H}{|}}{N}-\underset{|}{\overset{|}{C}}-$ 称肽键）与 20 余种不同的侧链（R 基）氨基酸中的另一个相结合，任何数目的氨基酸都能以这种方式连接成一条多肽链。一般将低于 20 个左右氨基酸长度的短链称为肽，含 50～100 个氨基酸的链是小的蛋白质分子，例如核糖核酸酶（RNase）含有 124 个氨基酸。大的蛋白质分子要含有 300 个以上的氨基酸，肌球蛋白是肌肉蛋白质中最大的一条多肽链，约有 1750 个氨基酸组成。

一般，肽链都有一个游离的氨基和游离的羧基分别置于两末端，称为末端氨基（N—末端）和末端羧基（C—末端）。它们赋予肽链在

不同的 pH 等条件下具有不同带电的电离特性。组成蛋白质的常见 20 种氨基酸中除了甘氨酸有两个相同的取代基之外,都有一个连接四种不同取代基的不对称碳原子,它就是使氨基酸具有手性特征的 α-碳原子。异亮氨酸和苏氨酸还带有第二个不对称碳原子。相接氨基酸所形成的肽键(—CO—NH—)具有部分双键的性质,使肽键与有关原子处于一个平面上,如图 7-1 例所示:

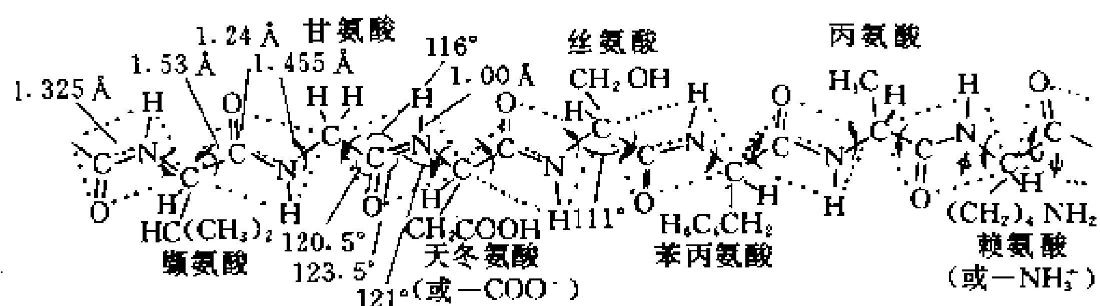
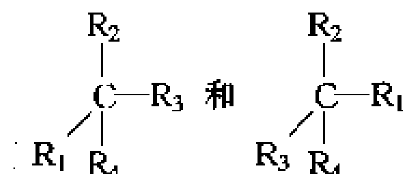


图 7-1　多肽链片段示例中氨基酸的连接与肽键平面简况

(C—N 肽键是 1.325Å 而不是单键 1.47Å)。∪表示该单键可旋转(N—C_α 和 C—C_α 键以 C_α 为顶点作旋转运动,旋转角度:后者为构象角 ψ,前者为扭转角 φ。(1Å=0.1nm)

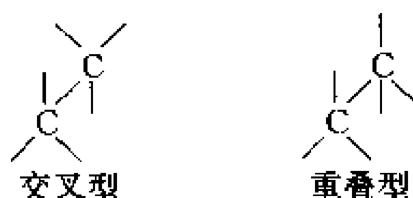
通常,各种蛋白质都有自己特定的氨基酸组成和连接顺序,蛋白质内的氨基酸顺序称为该分子的一级结构,构成一级结构键是共价键,包括 C—C、C—H、C—N、N—H、C—O、O—H、S—H、C ═ N、C ═ O 等键,还有连接多肽链内和链间的 S—S 键。它们的键能约在 8.4~12.5kJ/mol 范围。

蛋白质不是简单的链状伸展分子,它的立体结构可以有构型不同,即任何一个不对称碳原子上连接的各原子或取代基团的空间取向,都可能有两种不同的空间排列而形成两种不同的构型,也就是



构型的转变需要进行共价键的破裂和重组。此外,以共价键相连的

碳原子上各原子或取代基团，伴随着单键旋转可形成无数个空间相对排列的立体结构即无数个构象。构象的改变不需共价键的破裂和重组，不过，并非所有构象都能稳定地存在，通常连接单键结合的两碳原子上的六个取代基团或原子呈交叉型构象是最稳定的，而重叠型的最不稳定，见以下所示：



交叉型　　　　重叠型

多肽和蛋白质主链中的肽键具有部分双键性质，而且分子主链上还有庞大数量的侧链彼此影响而相互限制，使蛋白质只能存在少数几种甚至仅一个构象，蛋白质以特定的构象存在时才会呈现出特异性的生理活性。

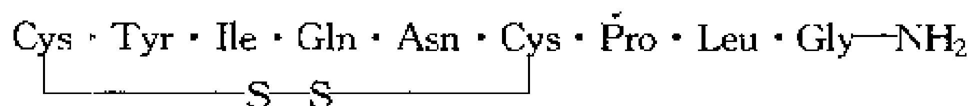
由于多肽链链内或链间存在荷电基团，于是链内或链间有可能存在静电作用的力（通称盐键，如—NH_3^+ ⋯ ^-OOC—，$H_2N\!\!\diagup\!\!C$ = NH_2^+ ⋯ ^-OOC—），这种力也可能在荷电基团与偶极基团、或偶极基团与偶极基团之间发生。链内的静电作用比链间的强。对于多肽链分子还存在范德华力（如—CH_2OH⋯$HOCH_2$—），在链内的基团间或分子链间都可能有范德华的吸引或排斥力，特别是一些庞大基团的色散偶极和诱导偶极间会呈现出主要的范德华作用力。通常，发生在氮原子或氧原子的未成键孤电子对与 NH 或 OH 中的氢原子间还存在氢键的相互吸引作用（如 —⌬ OH⋯^-OOC—）。此外，疏水基团间也存在相互作用力，俗称疏水“键”，这种疏水作用力的实质是呈现疏水基团相聚集的力（如 —⌬⋯⌬— ，—CH_3⋯CH_3—，—$CHCH_3CH_2CH_3$⋯ $H_3CCHCH_2CH_3$ ），它与溶剂有密切关系。除此之外，还可能有二硫键（如—CH_2S—SCH_2—）或酯键（如—CH_2COO—CH_2—）的存在。多肽链在一级结构的基础上按一定的

规律折叠或螺旋而形成链的不同构象，即称为肽链的二级结构（它主要是依靠氢键有规则维系的），然后，二级结构单元间因肽链手性和减少分子疏水表面的效应而形成结构域，进一步在三维空间中卷曲盘绕而联合形成整体排布的三级结构。甚至多个蛋白质分子链即蛋白质亚基集合，共同形成更高一级的结构（如四级结构），它可为蛋白质功能的修饰提供结构基础。蛋白质的折叠盘绕最终结果反映了相互依存的各种作用之共同参与，这就造成了蛋白质结构的复杂性。所有蛋白质都由于它的特定结构和构象而表现出特异性生理活性。

7.1.2 肽链与蛋白质的一级结构示例

天然多肽链或蛋白质的一级结构是由 20 余种 α-氨基酸中部分（按不同的特定顺序排列）参与组成的，详见第二章 2.4。此外，还有焦谷氨酸（暂以 Pgl 代表）和一些不常见的鸟氨酸、瓜氨酸等。

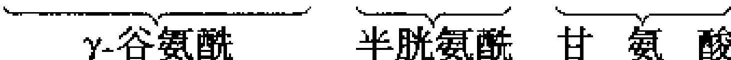
催产素（Oxytocin）是一个七种八个氨基酸构成的多肽链，它有调节代谢，使子宫和乳腺平滑肌收缩的功能，称作脑下垂体后叶激素。它的一级结构示意如下：



从左到右按顺序以羧基与氨基缩合成 $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\overset{H}{\overset{|}{N}}-$ 肽键连接，顺序中两个半胱氨酸上侧基—CH_2—SH 以二硫键—S—S—在肽链内连接，使该肽链必然卷曲。

从酵母等提取的谷胱甘肽（Glutathione，GSSG），是由谷氨酸侧基的 γ 碳上的羧基与半胱氨酸的 α- 氨基缩合成 γ 肽键，而半胱氨酸 α 碳上的羧基又与甘氨酸 α- 氨基缩合，形成谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸所组成的小肽，两个如此的小 肽依靠半胱氨酸侧基—CH_2—SH 上的巯基结合成肽间二硫键。它的一级结构为

COOH
|
$H_2NCHCH_2CH_2CONHCHCONHCH_2COOH$
|
$H_2C—S—S—CH_2$
|
$H_2NCHCH_2CH_2CONHCHCONHCH_2COOH$
|
COOH



牛胰岛素是由 51 个氨基酸组成的，相对分子质量为 5734，包含两条肽链，一条为 A 链，是 21 个氨基酸按特定顺序排列的 21 肽；另一条为 B 链，是 30 个氨基酸按特定顺序排列的 30 肽，而 A 链与 B 链之间以二对二硫键联系在一起。A 链内的第 6 位与第 11 位上的两个半胱氨酸以二硫键相连，从而形成链内小环(见图 7-2)。

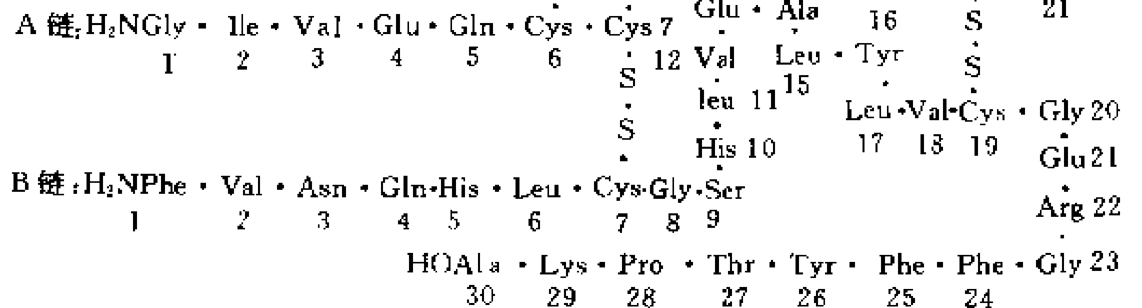


图 7-2 牛胰岛素的一级结构

(氨基酸顺序排列)

牛胰岛素是牛的胰脏所分泌的一种相对分子质量较小的激素蛋白，其主要功能即促进葡萄糖代谢，降低体内血糖含量，实现能量转移。如果胰岛素分泌不足，血糖浓度增高，则引起糖尿病而使生理部

分失调。注入胰岛素可治疗此病症。牛胰岛素的一级结构如图 7-2。

氨基酸不同顺序排列的一级结构是反映各类蛋白质的最基本特征，它呈现出蛋白质高级结构的决定因素，现已清楚地了解到约千种蛋白质分子中氨基酸的排列顺序。

7.2 蛋白质的二级结构

在蛋白质的一级结构中含有许多带非极性侧链的氨基酸（例如丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和苯丙氨酸），为了减少它们与水等极性分子的接触面积，大多数蛋白质会将其非极性侧链包裹在分子链折叠盘绕的内部。因此，除了上节阐述的各种作用力之外，这种疏水基团在水溶剂中的暴露程度会尽量地达到最小，也是蛋白质折叠盘绕的一种较大的驱动力。

值得着重提及的是水分子存在的氢键作用，它会促使蛋白质主链的肽链区域和肽链区域间交替地处于氢键域中，这对蛋白质折叠有着重大的影响，于是蛋白质主链上的羰基氧和 N—H 结合基团都沿着主链有规则地排列起来。

由于蛋白质主链上的原子间或主链上的原子与侧链 R 基团间等的距离不能远小于这些原子的范德华半径之和，这是原子或基团间范德华排斥力所决定的。于是主链单键（例如 N—C_α 和 C—C_α 等）的旋转运动有了空间效应的限制。

根据以上所述的种种原因，蛋白质只能存在少数的构象。天然蛋白质一般具有 α-螺旋、β-折叠、β-转角的结构。此外，往往在这三种结构之外还含有无规则盘曲，它有利于形成具有特定生物活性的球形构象。

7.2.1 α-螺旋结构

α-螺旋结构是蛋白质主链中一种最常见的典型结构方式，存在于羊毛等毛类纤维状蛋白质中，在球状蛋白质分子中也有如此的结

构方式。α-螺旋的多少其程度是由多肽链的一级结构相异而不同。在α-螺旋中的主链顺着弹簧状的走向形成了一种右手螺旋结构(见图 7-3)。螺旋每上升一圈(360 度)约含3.6个氨基酸残基,相当于沿螺旋体中心轴向上平移 0.54nm,折算每个氨基酸残基位置沿轴上升0.15nm,且沿轴旋转100度。

肽链中每个电负性很强的氮原子上之氢均可和螺旋结构顺序排列中每四位氨基酸残基的羰基氧原子形成氢键,螺圈间链内氢键的取向几乎与螺旋中心轴平行。由于α-螺旋结构中所有肽键都能参与形成链内氢键,因此α-螺旋构象是颇为稳定的,外形呈长杆状。

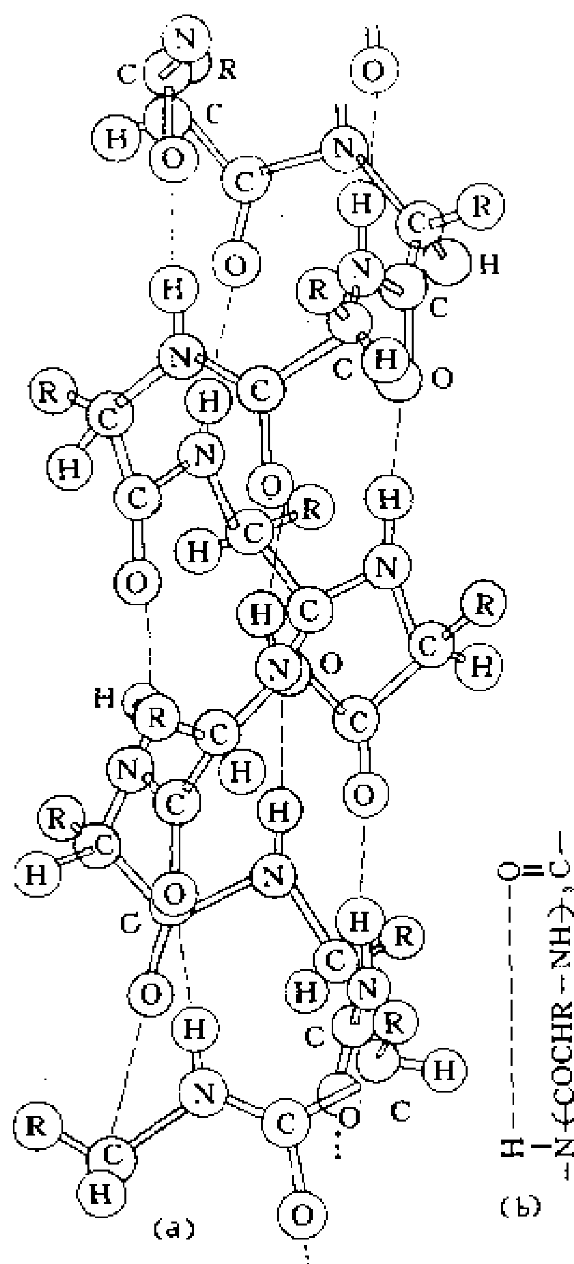


图 7-3
(a)右手α-螺旋结构示意(粗线代表主链,虚线代表氢键)
(b)氢键中O与H所在残基顺序的位置。

α-螺旋有右手螺旋和左手螺旋两种,α-右手螺旋在绝大多数的天然蛋白质中存在。它的特征是从R—CH—NH—端为起点,围绕着螺旋轴中心线向右盘旋。主链顺序上不存在甘氨酸残基时,出现左手α-螺旋的可能性仍很小。对于甘氨酸而言,R基团是与α位碳上H相同而使$C_α$不具有手性,它的左手构象与右手构象

完全相同，现已发现蛋白质内间有或含有左手 α-螺旋残基的现象可能与甘氨酸残基的存在有关。当第一圈 α-螺旋形成后，即为以后的残基形成螺旋奠定了基础，使其形成螺旋较容易些。按顺序，每一个新接上去的残基在其 N—$C_α$ 单键的扭转角 φ(也常称为构象角)由于空间限制而大致上都相等，因此该加入的残基主要是通过本身主链 $C_α$—C 单键构象角 ψ 的变化来取向，仅在适当的空间位置上能生成氢键后才产生稳定的构象。

蛋白质多肽链的螺旋体之形成和稳定是与它的氨基酸和排列顺序直接有关，如果链中有脯氨酸时，由于其 α-亚氨基上的氮原子参与组建肽键后没有剩余的氢原子可生成氢键，于是 α-螺旋在此中断，肽链则可能产生一个"拐点"。

7.2.2 β-折叠结构

β-折叠是蛋白质中另一类常见的二级结构(见图 7-4)，它由两条或多条颇为伸展的肽链并排在一起，依靠肽链中酰胺 NH 基团上的氢和并排相邻的肽链上羰基氧生成有规则氢键而形成之。由于各肽链上所含有的 NH 基和羰基处于反式位置，β-折叠便能延伸而成为多股排列，并呈扁平片层状。

β-折叠可以有两种不同的排列方式：一种是肽链的排列方向相同，都是有规则地将各肽链相应位置的羰基(或氨基)处在同一朝向排列[见图 7-4(a)]，此排列方式的折叠称为平行 β-折叠；而另一种肽链的排列方式是各肽链相应位置的羰基(或氨基)呈顺倒朝向而形成反平行 β-折叠[见图 7-4(b)]。前者存在于角蛋白等之中，后者发现于丝心蛋白等。无论是平行 β-折叠还是反平行 β-折叠，其肽链构象的特点是 R 基团在折叠片层两侧的指向都是正反交错，而肽链平面基本上都在某一片层平面上以满足肽链间形成较强的氢键。从能量的角度看反平行结构似乎更为稳定。虽然平行 β-折叠在肽链间的氢键键合方式比反平行 β-折叠的要好，但不如反平行 β-折叠那样伸展，而且折皱也比其明显。平行 β-折叠的每个残基对的重复周期为 0.65nm，而反平行 β-折叠的每个残基对为 0.7nm，所以平行 β-折叠

的重复周期较短，似乎内应力较大，而反平行β-折叠中相邻肽链相应位置的侧基R所具有的疏水力，有利于多股排列的稳定性。

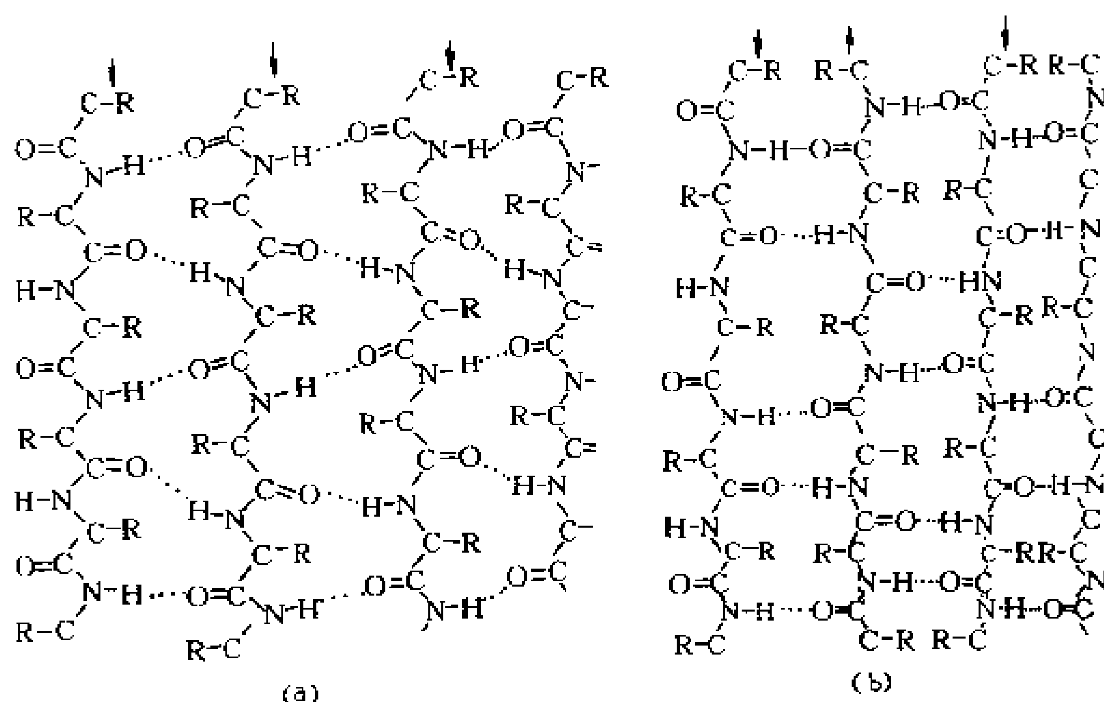


图 7-4　β-折叠结构示意

(a)平行形式；(b)反平行形式。(箭头代表排入方向)

7.2.3　β-转角结构

一种使肽链的走向发生改变的结构方式称为β-转角。显然，肽链弯折成密集的球状时需要这种转角方式来改变肽链的走向，反平行β-折叠中肽链的那些相邻末端很可能是以这种转角方式连接的。现已发现氨基酸顺序排列链发生转折时有多种不同构象的β-转角，参见图7-5。

甘氨酸和脯氨酸一般出现在β-转角中。甘氨酸在肽链的区段与区段间所起的构象之作用，犹如易于弯曲的铰链。如果没有甘氨酸，则其它氨基酸侧基的空间效应将会使肽链在构象上处于较伸展的状态。脯氨酸在肽链的顺序中氮上没有建立氢键的多余氢质子，而其环状侧基使C_α—N键空间旋转的扭转角自由度仅限于导致转角的

几何学特性状态。

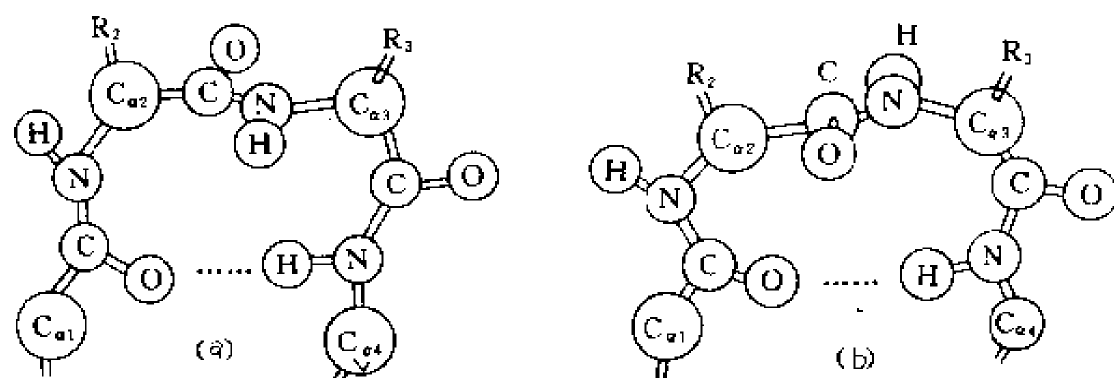


图 7-5　β-转角中两种主要的转折类型

(a)类型Ⅰ,(b)类型Ⅱ。在类型Ⅱ中,R_3 一般是甘氨酸的 H。

7.2.4　肽链二级结构的形成和氨基酸顺序的一些影响

在研究蛋白质结构的过程中,现已发现各种氨基酸在形成二级结构时有着不同相对几率的倾向。谷氨酸和丙氨酸形成 α-螺旋的相对几率最大;缬氨酸、异亮氨酸、天冬酰胺和丝氨酸在 β-转角的构象中最常见。这些信息对根据氨基酸顺序而推测蛋白质的二级结构区段方面显然是很有价值的。不过,要从氨基酸顺序来推测蛋白质结构,还需考虑各种小区段相互作用和大区域相互作用的具体情况(例如电荷配对和紧密堆积)等其它效应的影响。一般来说,一个已确定的构象中所测得的各种氨基酸的出现频率,与各氨基酸在未知结构又有类似特性的排列顺序中出现的几率是相等的,所以从顺序上来测定个别氨基酸所出现的几率,以及平均有几个残基相邻的局部区段(这是为了考虑形成二级结构时的协同效应),就有可能推得二级结构。例如,Gly—Pro—Ser 区段很可能形成 β-转角的构象,而顺序 Ala—His—Ala—Glu—Ala 很可能形成 α-螺旋的构象。不过,这种根据所测得的顺序来推定的结果与实际上的构象并不完全一致。

7.3 一些二级结构的纤维蛋白实例

纤维蛋白是一种由伸展的或呈 α-螺旋状的肽链缠绕在一起所形成的纤维。

7.3.1 角蛋白类

角蛋白类是构成生物组织例如毛发、角、蹄、鳞、羊毛、喙、指甲和爪的主要成分，由此可见，它是形式最多的一种纤维蛋白。其中具有 α-螺旋构象的肽链所组成的 α-角蛋白最为普遍，在毛发、羊毛中的 α-螺旋结构是典型的 α-角蛋白，构成这些组织的肽链具有很长的 α-螺旋，而多股 α-螺旋并排再盘曲缠绕而形成长缆状，长缆状的肽链又在总体上形成左手螺旋。此时 α-螺旋上的侧链氨基酸残基也以最适当的状态起着裹束作用。

由于 α-螺旋的长缆状结构具有拉伸时缠绕松开，外力去除时又能弹回的倾向，所以毛发和羊毛纤维具有弹性。又因相邻 α-螺旋或纤维的肽链上之半胱氨酸残基形成二硫键而发生共价连接，这种共价连接影响着整根毛发纤维的卷曲程度，因此，在上述的情况下半胱氨酸残基在肽链顺序中的相应位置也是天然毛发卷曲与否的重要决定因素。螺旋间二硫键的还原断裂：重新氧化和重新组合等所有这些化学反应以及物理处理是实施“烫发”的基础。过分地氧化等能使二硫键断裂而不能重新组合，毛发就会发生“开叉”现象。

7.3.2 丝纤蛋白

昆虫所产生的丝纤蛋白是第二类纤维蛋白。从丝纤蛋白的顺序测定发现，它主要由甘氨酸、丝氨酸和丙氨酸组成的，其中每隔一个残基就连接一个甘氨酸。丝纤蛋白在结构上由线形的反平行 β-折叠堆积而成片层。甘氨酸残基都排在片层的一表面上，而其它氨基酸残基排在另一表面上。反平行 β-折叠片层上的侧链基团交替指向片层平面的上下方。当两个或两个以上这样的片层紧密集合一起而形成片层堆积结构时，相邻的由甘氨酸所占据的片层表面和相邻的由

丙氨酸所占据的片层表面都相互锁合(参见图7-6),因此丝纤蛋白在机械性能上可以说是一种刚性材料而不易被拉长。

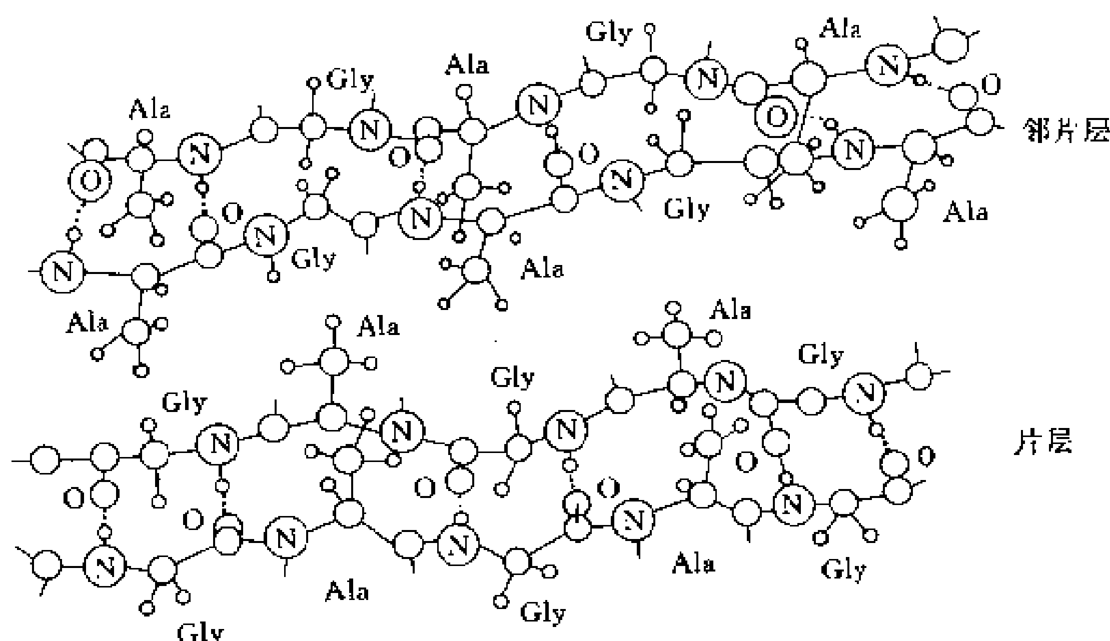


图7-6 丝纤蛋白结构

片层上的侧链很适当地安置在两个相邻片层之间,并相互锁合

7.3.3 胶原

胶原是构成腱和大多数结缔组织的主要成分,它是一类特别坚硬又不易伸展的结构蛋白。根据氨基酸顺序分析,胶原的特征成分中含有Gly—X—Pro或Gly—X—Hyp的三肽重复顺序(其中X可以是任何一种氨基酸残基,Hyp是脯氨酸的羟化衍生物)。脯氨酸残基在顺序中重复出现,使胶原不可能形成α-螺旋和β-折叠构象,而单条肽链却形成一种左手螺旋构象,其氨基酸侧链依次有规则地处于等距离的三个方向而形成等边三角形阵势。三条左手螺旋的单链又以右手螺旋的方式相互盘绕而绞裹在一起,三股螺旋内所存在的空间只允许容纳甘氨酸的H,无法容纳其它任何氨基酸的R基团,于是每3个残基中必须有一个甘氨酸,且都位于内侧。

胶原中单链螺旋与α-螺旋不同,其形成时内部残基间并不存在氢键的锁合,所以螺旋相当伸展,不会像α-螺旋那样易被再拉长。当

胶原的 3 条单链绞裹成三股螺旋时，每条单链与相邻的其它单链间是具有氢链锁合而形成一种高度紧锁的纤维结构。这种纤维蛋白结构不仅能把肌肉和骨骼坚固地连接起来，且对皮肤和结缔组织的结构具有加固作用，因此它具有很能适应生物学功能的特性。胶原与角蛋白及丝纤蛋白一起成为毛发、皮肤、肌腱、韧带、软骨等的主要成分。

以上讨论的三种蛋白在结构、性质上了解得较清楚，其中 α-角蛋白和丝蛋白的二级结构在球蛋白中也较常见，而胶原的作用较特殊，当胶原蛋白的生成和配置异常时，往往会导致骨骼畸形、关节疾患等。除这些之外，生物体内还存在有其他形式的蛋白质和以多糖为基础的结构材料。

7.4 蛋白质的三级结构

蛋白质分子完整链在二级结构基础上，由 α-螺旋、β-折叠、β-转角等二级结构域间相互配置构成三维空间中特定的构象而呈现出三级结构。

7.4.1 肌红蛋白示例

一种功能和血红蛋白极为相近的，为哺乳动物肌肉贮储和运输氧而被称作肌红蛋白的蛋白质分子，是由 153 个氨基酸残基构成的多肽链和一个血红素辅基所构成的，它的相对分子质量为 17800。Kendrew 等于 1963 年应用 X-射线衍射测定了鲸肌红蛋白的空间结构。

图 7-7 所示的肌红蛋白分子是由一条含有 85% α-螺旋多肽链盘绕成外似球形，而内为袋形空穴的不对称结构。在整个多肽链内含有 8 个螺旋区段，区段长度约为 7～24 个氨基酸残基形成的螺旋并不均等，这些区段间或拐角处则呈现出其它构象。脯氨酸以及难以形成 α-螺旋的异亮氨酸、丝氨酸等都处于拐角区段。其袋形空穴内有一个血红素辅基伸出分子表面，而血红素中央的铁原子能结合

氧。八面体配位的铁原子连接在肌红蛋白分子第93位(末端氨基的氨基酸残基数起)的组氨酸侧链上。铁原子的4个配基是血红素的4个氮原子,它与氧分子结合于第6配位键。

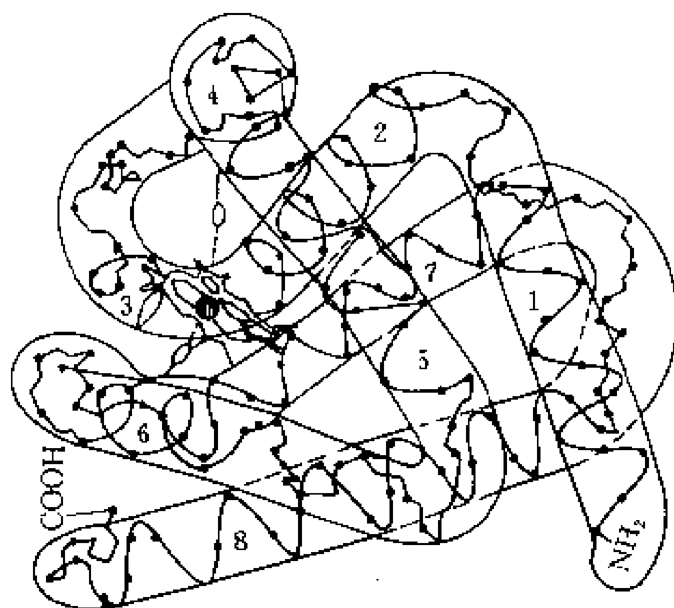


图7-7 肌红蛋白的三级结构

肌红蛋白的晶体和溶液中所表征的光谱有相似的类形,采用旋光研究方法估算的螺旋含量与X-射线晶体衍射法所得的结果相吻合。此外,还发现抹香鲸与海豹的肌红蛋白之分子折叠类型很相似,即不同种属动物的同种分子具有极为相似的构象。还有,肌红蛋白和血红蛋白虽然存在于不同的生理部位,但它们的构象亦很相似。肌红蛋白分子中具有极性基团侧链的氨基酸残基几乎全部分布在分子的表面,而非极性的残基却被埋在分子内部,这些基因编码的氨基酸顺序决定了折叠盘绕方式和位置,也决定了疏水内壁的袋穴结构。分子表面的极性基团可与水分子结合,使肌红蛋白能分散于水溶液中。

7.4.2 球蛋白三级结构

对于球蛋白和酶的三级结构进行研究后,发现它们往往由二级结构各种构象的区段(或结构域)组建而或多或少地形成球状。例如

图 7-8 所示的溶菌酶是含 129 个氨基酸残基组成的蛋白质，它有一部分区段呈现有规则的 α-螺旋和反平行 β-折叠的二级结构，还有一些弯曲区段和伸展区段是含有 β-转角和构象不太规则的伸展肽链。从 200 种左右蛋白质的结构测定结果中看到结构排布是多种多样的。蛋白质的每一不同的顺序总是形成一种独特的三级结构。不过，许多蛋白质在基本结构上因手性效应和空间效应的影响，而均具有某些相似之处。

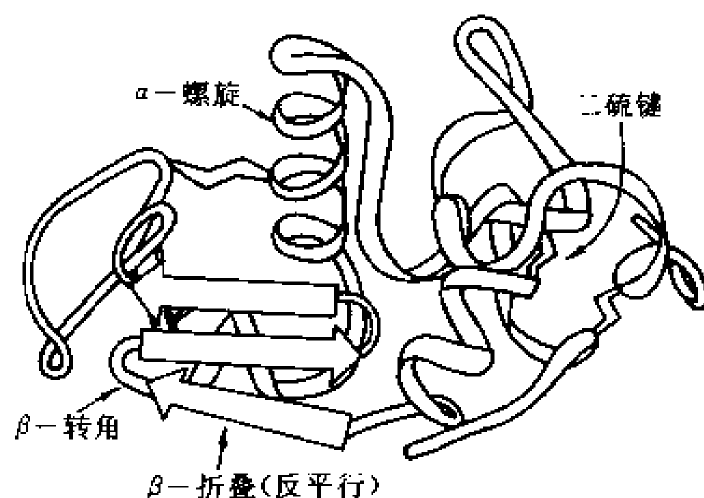


图 7-8 卵清溶菌酶示意

（主链用条带和箭板表示肽链走向）

手性效应系指蛋白质中伸展的结构区域具有特定的“手型”倾向，此现象反映了该处肽链由手性 L-氨基酸组成的信息。手性效应既呈现在球蛋白中二级结构区域间的连接部位，也呈现于球蛋白内 β-折叠的几何特征上。空间效应关系到 α-螺旋和 β-折叠等二级结构区域如何才能最有效地缠绕在一起，而使蛋白质与溶剂的接触表面裹束得最小，这对三级结构的形态至关重要。由于不利的空间效应，使实际上能够存在的肽链构象数目受到限制。显然，由于构成肽链的原子间具体作用力的影响，α-螺旋的排布状态最有可能稳定地存在。假如肽链伸展的区段主要是由具有手性的 L-氨基酸组成，那么伸展肽链的稳定构象不会是平直的，而具有轻度卷曲成右手螺旋的

倾向，并在总体上产生了按右手方向盘绕的伸展结构。

球蛋白的反平行 β-折叠区域相邻肽链间，是以简单发夹回转方式(参见图 7-8)在片层的同一侧连接成主链。如果肽链在平行 β-折叠区域，主链在片层相邻肽链间便以不同的两侧连接而形成肽链交错走向，即主链可绕过相邻肽链所形成面的上方以右手方向将两侧头尾相连，或者一条 β-折叠链由主链绕过片层面的下方以左手方向与相邻的另一条 β-折叠链相接，然而，实际上现在所观察到的蛋白质结构中似乎所有交错走向连接都是右手方向的。球蛋白为使构象能量达到最小，沿伸展的肽链方向，其 β-折叠总是向右手方向扭曲。图 7-9 系四种蛋白质肽链折叠形态示意图。

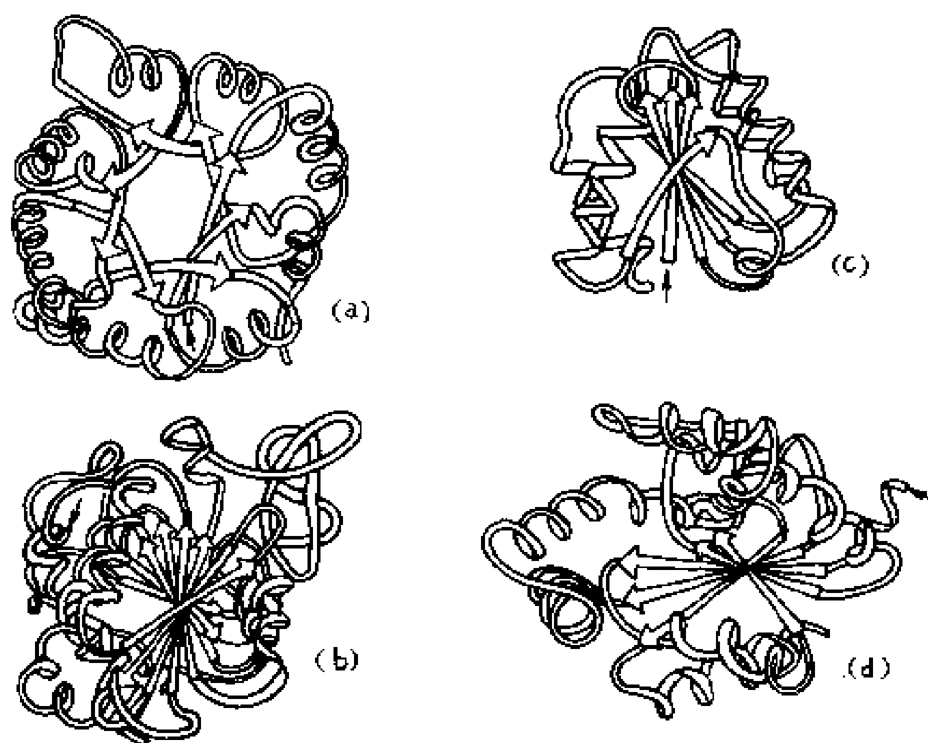


图 7-9 部分不同酶的结构骨架比较

(a)丙糖磷酸异构酶(β-折叠圆筒形排布)；(b)蛋白质外切酶-羧肽酶(马鞍形排布)；(c)电子转移蛋白-黄素蛋白；(d)腺苷酸激酶。

对已知球蛋白的观察得知，总是向右手方向扭曲的 β-折叠通常可构成蛋白质结构的骨架，但它们的整个肽链的几何形态各不相同。

手性作用影响平行β-折叠链间连接情况及其片层的几何形态，使平行β-折叠链间的交错连接都是右手方向。对于形成平行β-圆筒形结构中心空间部位是唯一容纳疏水侧链的场所，β-折叠链的交错连接不允许通过中心部位已成为一种规律，每连接一条β-折叠链，蛋白质主链都以右手螺旋或环圈，在圆筒外侧围绕和裹束。

蛋白质外切酶——羧肽酶或电子转移蛋白——黄素蛋白中一些平行β-折叠的组建呈马鞍形骨架。由于右手交错连接，肽链必须顺着β-折叠片层，有的沿一个走向，有的朝另一个走向，使平行β-折叠片层每一侧都有一些螺旋和环圈裹束着，即发现在β-折叠片层间的连接肽链从一条到另一条的普遍行进方向，是由片层中间开始向一端缠绕，并以右手交错连接在片层的一侧而使裹上了一层螺旋，然后肽链又经片层中间再向相反的一端缠绕，致使片层的另一侧也缠上一层螺旋，肽主链如此组建的形态，通常称为“核苷酸连接区”，因为发现大多数已知蛋白质都在β-折叠链的羧基端中间尚连有一个单核苷酸或二核苷酸辅助因子。

手性作用对于蛋白质中反平行β-折叠片层结构及其周围肽链缠绕的几何形态也有一定的影响。图 7-9(b)所示蛋白质内切酶——羧肽酶就具有平行和反平行的混合β-折叠。这种β-折叠的扭曲形态在蛋白质结构排布中是一个重要的特征。在反平行β-折叠的蛋白质中，普遍的结构形式是有两层基本分开的β-折叠，这样可将疏水部分包埋起来，而单层是不稳定的，马鞍形片层表面和扭曲的圆筒间通过遍布于周围并交错地排布的氢键，紧密地联系在一起而排布在相对的方位上。

由上可知，许多蛋白质完整的三级结构，可由各个不同的二级结构单元(或称结构域)有效地、一定程度上灵活地聚集在一起组建的，一种常见的形式是β-折叠链与紧密裹束在片层表面并向外延伸的α-螺旋相连成为βαβ环。虽然这种结构在已知蛋白质的三级结构中是常见的，但还发现有其它的排布方式，它们的几何形态更为复杂而不规则。二硫键或辅基的几何形态(或聚集状态)也会影响结构排布。

7.4.3 膜蛋白特殊的三级结构基本特征

生物膜内部是以疏水为特征的环境，膜蛋白不可能成为以疏水基团暴露得最少的形态结构，所以高度结构化的蛋白质在膜内如何折叠盘绕，可以说根本上不同于其它多数蛋白质。

通过高级电镜等技术，已能得到细菌视紫红质这种蛋白质存在于膜内时的三维结构初步而粗略的图像。细菌视紫红质存在于一种生活在沼泽中的细菌膜内，它含有一个视网膜辅基，该辅基与视觉受体蛋白视紫红质中的辅基相类似。组成细菌视紫红质分子的肽链含有 247 个残基，并排布成内有 7 个 α-螺旋的束，螺旋的长轴近似垂直于膜的表面。依据残基数估计，位于膜内的所有肽链需形成 7 个 α-螺旋，使螺旋长度约 4.0nm 而能足以横跨膜又存在于膜内，于是螺间的相互连接链是很短的(见图 7-10)。

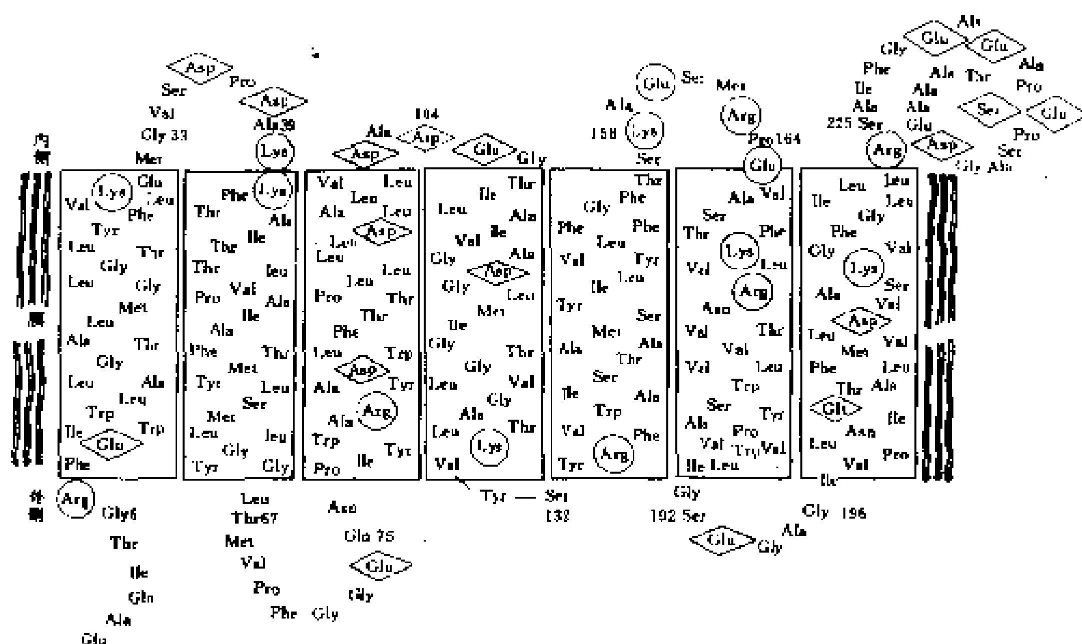


图 7-10 细菌膜中视紫红质的氨基酸顺序所形成的直立状 α-螺旋结构投影示意

7 个螺旋可能会分为二列，在二列螺旋内侧表面带电基团发生相互作用，而外侧疏水表面暴露于膜的脂质侧链中。

人们发现处于膜内的蛋白质结构区域主要呈现出 α-螺旋形态，

除了末端外主链的三级结构是完全氢键化了，而将疏水基团尽可能暴露在表面，这样它们就很容易埋人疏水环境的膜内。从已知顺序和观察到的螺旋结构推定，嵌膜蛋白只能将其疏水的侧链暴露在膜内部的疏水环境中，致使 α-螺旋中带电的氨基酸侧链，以互补形式相互间在蛋白质内部发生作用，这与中子衍射试验所得出的缬氨酸位于螺旋外表面的结果是一致的。以上说明膜蛋白细菌视紫红质与存在于水这种极性环境中的蛋白相比，在结构上疏水侧基与亲水侧基的排布基本是内外相反的。

7.4.4 某些酶的袋穴构象

某些酶的多肽链通过侧链基团的相互作用，进一步盘曲折叠，并借助次级键维系形成特定的构象结构，肽链中所有原子都将在空间位置上重新排布，原来在一级结构排列顺序上相隔较远或很远的氨基酸残基有可能集中到特定的区域，构建成具有内陷凹穴（称为活性中心袋穴）的特定生理活性的球状蛋白质分子〔图 7-11(a)〕。这种袋穴部位往往会和其它分子结合及相互作用，并以特定排布方式使蛋白质分子中某些氨基酸基团共同参与决定蛋白质的特定生理功能，例如酶的催化等功能。

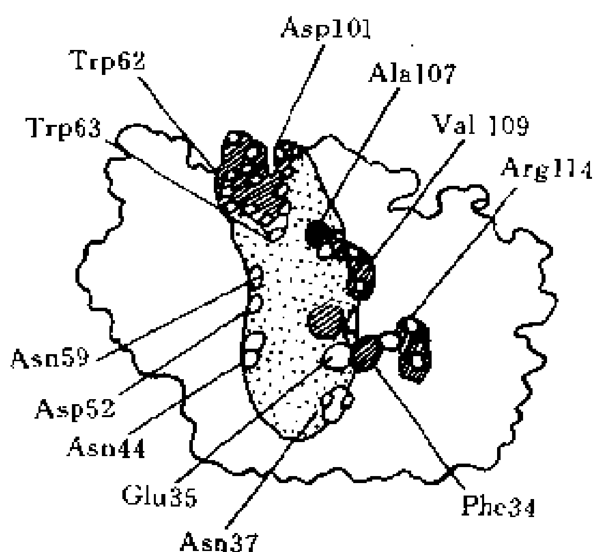


图 7-11(a) 蛋白质分子表面的袋穴

胰凝乳蛋白酶分子就是上述这类蛋白质中的一个典型例子。图 7-11(b)显示出胰凝乳蛋白酶主链的折叠并构建成袋穴的情况。

根据化学和 X-射线方面的研究，发现胰蛋白酶、弹性蛋白酶不仅与胰凝乳蛋白酶有共同的结构，而且尚有共同的催化机制。对于胰蛋白酶，已确定该酶的袋穴以 214～220 残基、一个二硫键和 191

~195 残基为界，而残基 215~219 这条边是底物的结合部位。多肽底物一部分以反平行方式借氢键与酶分子 215~219 残基结合，而使

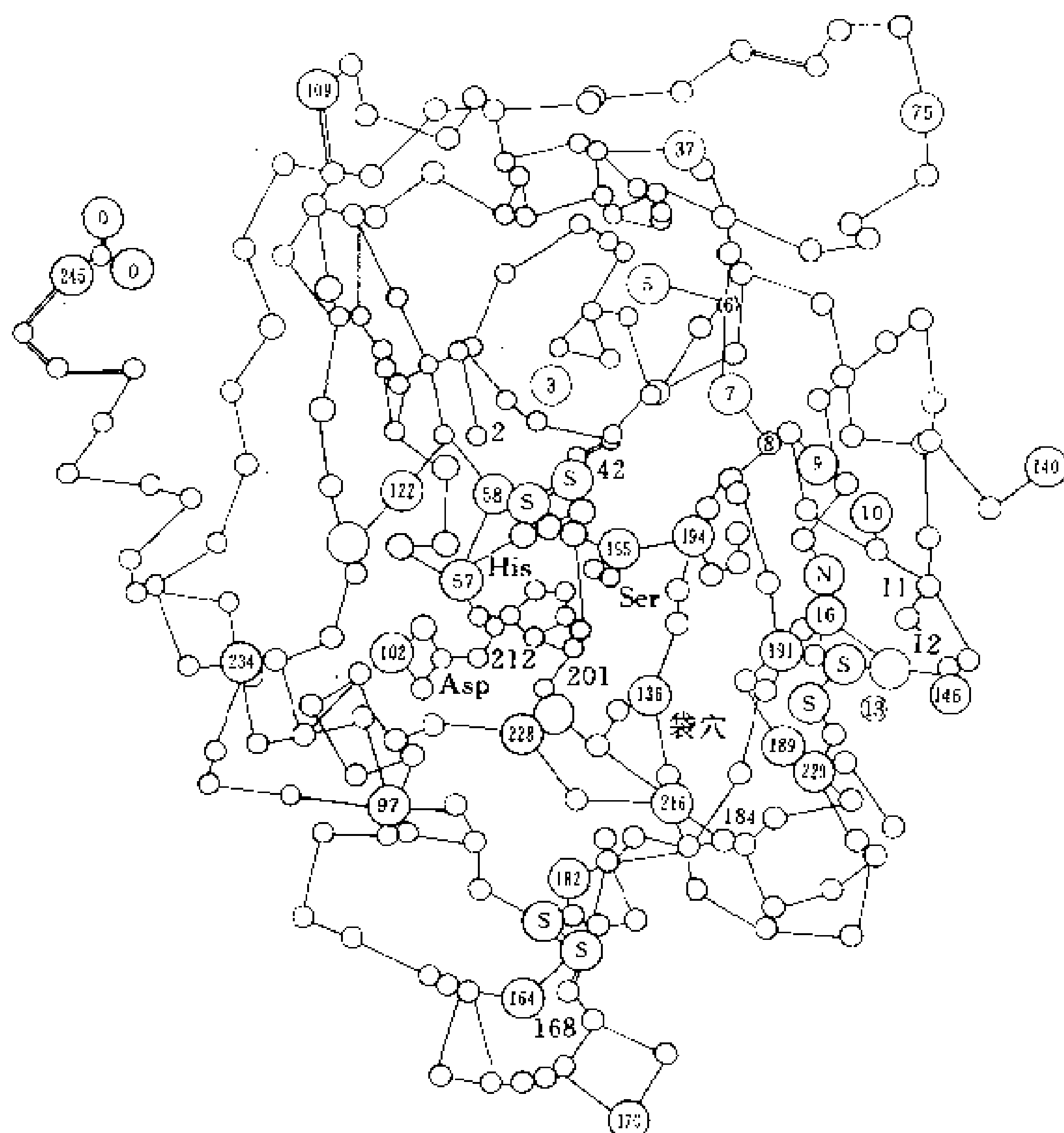


图 7-11(b)胰凝乳蛋白酶构建袋穴的情况和主链的折叠构象

底物就位。胰蛋白酶的专一性袋穴较深，其底部由 Asp 189 提供一个负电荷，因而可接受长而带正电荷的碱性侧链，例如赖氨酸或精氨酸。胰凝乳蛋白酶的相应袋穴比较宽，并完全由疏水侧链排列而成，所以能有效地接纳庞大的芳香基团。在弹性蛋白酶的袋穴中因缬氨酸和苏氨酸代替了上述两种酶相应的甘氨酸位置而封闭了袋穴，致

使任何稍大于甲基的侧链都不能伸展入袋穴，于是它们的催化水解性能就有专一性的区别。

7.5 蛋白质的四级结构

在生命体系中，有许多单体球蛋白可作为功能单位而存在活性，还有更多的是复合蛋白装配，这种由几条具有三级结构的多肽链装配成一个高度有序排布的功能性聚集体，称为蛋白质的四级结构。其中每一条多肽链称为亚基，常似球状。四级结构的蛋白质具有完整的生物活性。

7.5.1 血红蛋白示例

起着将氧气从肺输送到各种组织内的毛细管中，以满足细胞代谢所需为主要作用的血红蛋白分子，就是上述蛋白质结构与功能关系的一个很好例子。它的相对分子质量为64500，含有4个亚基，即由两条α-链和两条β-链等两种不同类亚基组成的四聚体，每一个亚基均含有一个血红素辅基，见图7-12。血红蛋白内的α-链由141个氨基酸组成，β-链由146个氨基酸组成，显然，它们的一级结构差别较大，各自都有一定的排列顺序，但它们的三级结构似乎都和肌红蛋白很相似。

血红蛋白分子中的α_1、α_2、β_1和β_2链各自折叠卷曲，在N—端和C—端以及各α-螺旋区段间都有长短不一的松散链而形成三级结构。它们将疏水侧链尽可能地排布在分子内部，极性基团暴露在分子表面上，于是分子间以相互凹凸相嵌排列，通过分子表面间的一些如盐键和氢键等次级键结合在一起。

血红蛋白的生理学反应与肌红蛋白有很大的不同，血红蛋白以四聚体存在才有较高协同效应，当任何一个血红素与氧分子结合时都要受到其它三个所处的状态影响。似乎第一个血红素与氧结合的亲和力较低，随后每个血红素与氧结合的亲和力(即随着氧结合量的增加)都相应地增高。然而，肌红蛋白是以单体形式存在，虽然在氧

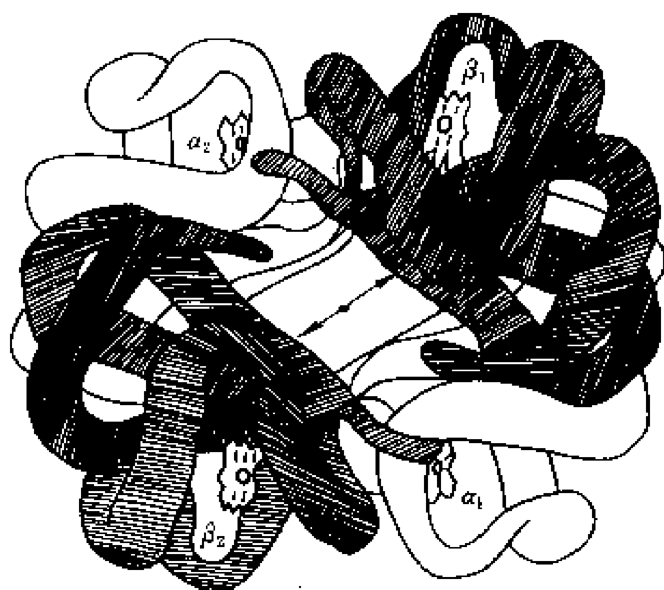


图 7-12

血红蛋白的 X-射线晶体衍射，以 β 链为顶部沿二次对称轴向下观察的俯视图。$\alpha_1\beta_1$ 和 $\alpha_2\beta_2$ 二聚体可作为基本单位相互间相对移动，能使二磷酸甘油酸结合到去氧构象的中心袋穴之中。

分压高时这两种蛋白分子所能结合的氧量（以重量为基准）大致相等，但当氧分压低时，血红蛋白对氧的释放要容易得多。图 7-13 是它们的纯蛋白水溶液之氧合曲线。肌红蛋白血红素与氧的一对一结合的简单关系是

$$Mb + O_2 \rightleftharpoons MbO_2$$

$$K_f = \frac{[MbO_2]}{[Mb][O_2]} = \text{结合平衡常数} \qquad (7.5\text{-}1)$$

如果氧浓度以氧分压（P_{O_2}）表示，设 y 为肌红蛋白分子的氧饱和分数，则

$$K_f = \frac{y}{(1-y)P_{O_2}} \text{或} \ y = \frac{K_f P_{O_2}}{1 + K_f P_{O_2}} \qquad (7.5\text{-}2)$$

以上呈双曲线方程。血红蛋白的行为不同，它的结合平衡常数表达式与氧浓度的多次幂有关，其氧合曲线呈 S 形。

$$K_f = \frac{[Hbo_2]}{[Hb][o_2]^n} \text{或} y = \frac{K_f P^n_{o_2}}{1 + K_f P^n_{o_2}} \qquad (7.5\text{-}3)$$

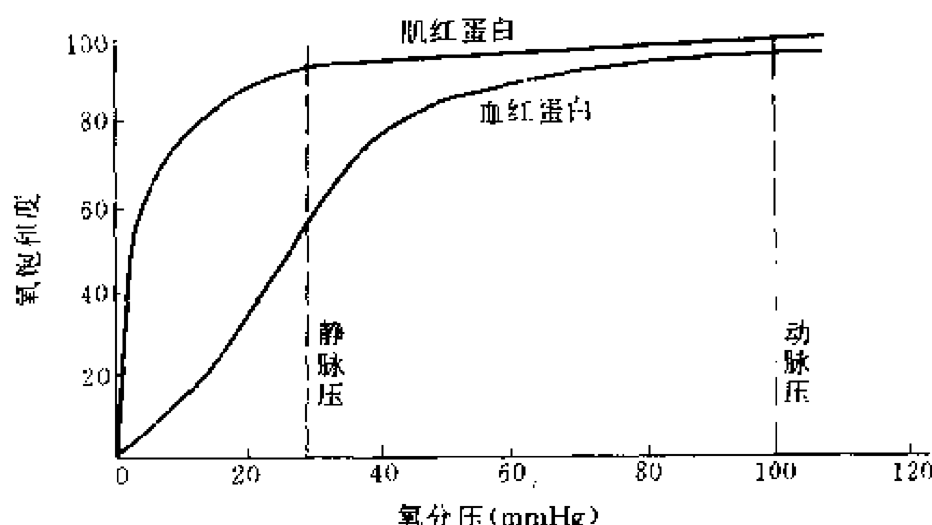


图 7-13 血红蛋白与肌红蛋白同氧的亲和程度的平衡曲线

式中 n 值一般为 2.8,表明血红蛋白的 4 个血红素与氧分子的结合是相互影响的。血红蛋白的 n 值是氧合程度的函数,n>1 一般表示有协同结合效应;n<1 则为负协同结合。肌红蛋白是 n=1,在任何氧分压下,肌红蛋白同氧的亲和力总要比血红蛋白高,因而能把氧从血液输送到肌肉中,也可透过毛细孔从空气中直接捕获氧。显然可以看到蛋白质的四级结构与其功能有着密切关系。

7.5.2 四级结构的变构现象及其效应

经 X-射线晶体衍射法对完全氧合的血红蛋白和脱氧血红蛋白的结构进行研究,发现血红蛋白能在显著差异的两种状态之三级结构和四级结构间呈现变构现象,而部分结合氧的血红蛋白却介于上述两种极端状态之间的中间结构,于是可利用这两种状态的模型作为基本概念来描述血红蛋白变构现象的机理。

可以认为,血红蛋白四聚体是由两个相同的二聚体($\alpha_1\beta_1$ 亚基和 $\alpha_2\beta_2$ 亚基)组成的。这些二聚体亚基是紧密结合在一起,而二聚体亚基能相互移动。当血红蛋白处于脱氧构象时,在可移动的二聚体之

间的界面上含有由盐键和氢键连接而形成的网状结构。氧合构象时,这些盐键和氢键断裂,二聚体间相对移动,导致血红蛋白的四级结构发生了变化。

H^+ 浓度会对血红蛋白的氧合作用有影响,降低 pH(即 H^+ 浓度增加)会减少血红蛋白对氧的亲和力。例如,pH = 7.6 和氧分压为 40mm Hg(5.33kPa)时,血红蛋白结合氧的百分率可保持在 80% 以上,而 pH 降低至 6.8 时只能保持结合氧为 45%。还有 2,3-二磷酸甘油酸能结合在脱氧血红蛋白 β 链间的中心袋穴内,促使氧和血红蛋白的亲和力减少。不过,在体内正常存在的浓度下,无论是 H^+ 还是二磷酸甘油酸都不会妨碍血红蛋白在肺组织内对氧的近饱和吸收。pH 的微小变化(7.6~6.8)和增加二磷酸甘油酸至 5mmol/L 低浓度便会引起血红蛋白结合氧的大量释放,这样会在氧分压较低或高度需氧时更加有效地对耗氧组织输送和提供氧气而可能起着生理调节作用。在代谢旺盛而需氧时质子浓度往往会升高,在高海拔低供氧地区的生物红细胞中二磷酸甘油酸的浓度一般都较高。质子和二磷酸甘油酸与氧的各自结合在血红蛋白上的位点是不同的,由此得悉一个配体结合后会对另一配体的结合产生影响,必然是肽链具有传递作用,表明氧、质子与二磷酸甘油酸和血红蛋白的结合都会引起三级和四级结构的变化。这些小分子配体通称为变构效应物。

结合在血红素基团上的氧所引起的三级和四级结构变化会使氧的结合出现协同效应。经研究认为,氧原子的结合(或释放)会引起血红素辅基上的中心 Fe^{2+} 离子移位和外层 d 轨道发生重排,牵动了与其配位相连的第 6 螺旋区段内组氨酸,促使第 6 区段螺旋构象改变,导致血红蛋白其它部分也发生变构,因而促进了脱氧结构向氧合结构的(四级结构)转化,有利于氧在血红蛋白四聚体内其它血红素辅基中心 Fe^{2+} 离子空位上进一步结合。

7.5.3 蛋白质的四级结构基本类型

蛋白质的四级结构可分为两种不同的基本类型。第一种是不同种类亚基的装配。例如含有不同分子亚基的二聚体以至还含结构组

分核酸的核糖体那样复杂聚集体。不同分子亚基邻近间所发生的各种相互作用的特性决定这类四级结构的组建方式。通常这类复合结构具有很不规则的几何形态。第二种是由多考贝的一种亚基或几种不同的亚基组成的聚集体,由于亚基间特定结构的相互作用重复发生,致使这类聚集体形成了典型有规则的立体排布,而成为较常见的四级结构方式。

只要蛋白质分子中含有手性的 L-氨基酸,则它的四级结构基本上是不对称的,其四级结构中最简单的方式是形成线性聚集体。由于装配的相邻亚基间有一种特定结构所需的相互作用可重复地发生,若继续加入亚基,这样的结构还会延伸。比线性排布更为常见的是相同亚基的螺旋状排布。这是由于每个亚基相邻之间所发生的一些相互作用各有不同所致,但作用方式却是重复的,可见图 7-14 蛋白质分子四级结构的各种亚基排布。图中以右脚板形象来代表简化了的亚基。

螺旋状亚基聚集体的例子有棒状和丝状病毒,它们的整个外壳由同一种蛋白亚基通过重复的相互作用,以螺旋方式多拷贝地进行聚集而装配成能容纳病毒核酸的圆筒形集合体,见图 7-15。螺旋状四级结构中的亚基通过重复的相互作用将它们连接时是沿中心轴上升转动,于是具有无限延伸成棒状或丝状的可能。

蛋白质四级结构的构象除上述之外,还有可能存在其它的类型。例如以“脚板”描述的两个亚基以“脚趾”与“脚跟”侧面相靠,通过相互作用进行连接而形成具有两次旋转轴的二聚体;三个亚基通过“脚趾”侧向相同的相互作用而形成三次旋转的三聚体;四个亚基形成四聚体(如血红蛋白),其中亚基间发生三种不同的作用,即“脚板”的侧边作用而使“脚板”反平行靠拢,“脚趾”与一“脚趾”作用和该“脚跟”再与另一“脚跟”作用而“脚底”对“脚底”交错重叠,于是可呈现三根二次旋转对称轴构象;还有“趾-跟”相连而呈正三角形,再“底-底”星形重叠而形成具有一根三次旋转轴和多根二次旋转轴构象的六聚体和“趾-跟”相连呈正方形,再“底-底”相合重叠而形成具有一根四次

旋转轴和多根二次旋转轴的八聚体;较复杂的有24个亚基组成的正六面体四级结构、60个亚基组成的二十面体四级结构等多面体。

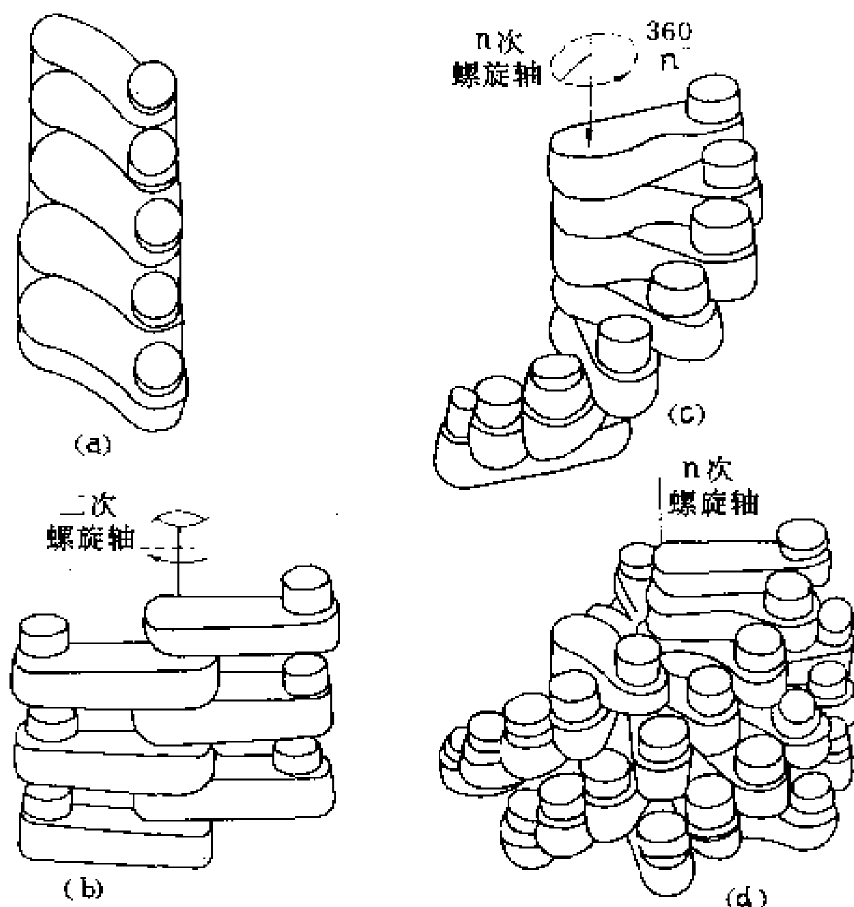


图7-14　蛋白质的线状和螺旋状四级结构

(a)亚基沿线性方向平移连接,所有相互作用均相同;

(b)二次转动轴(即每次转动180°)的螺旋状排布;

(c)含每次转动$\frac{360}{n}$度之n次螺旋轴的螺旋排布;

(d)多起点综合的n次螺旋排布。

以X-射线晶体衍射研究蛋白质的构象中尚发现:四级结构内部相同亚基间的相互作用会出现不对称和不等同结合的现象,例如已糖激酶中相同亚基的不对称结合使亚基在构象上产生了显著的差异,使亚基聚集体的一些活性部位具有完全不同的功能性质。又例如二十面体病毒中一些亚基以不等同的结合方式相互连接。这种不

等同结合会使亚基装配成更大更复杂的结构，从而具有多方面的功能。如果蛋白质含有多种亚基，再与核酸类、辅基和钙、镁、铁等金属离子相互作用，将会形成更高级的结构。

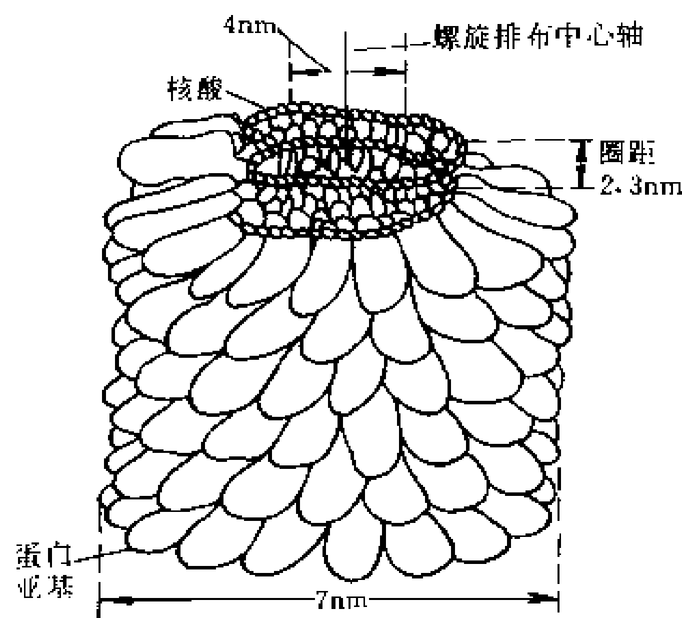


图 7-15　烟草花叶病毒的外壳蛋白
（TMV，单链 RNA 病毒）

7.6　蛋白质结构与功能的关系

人们已发现，蛋白质所具有的功能是由它的一定结构和空间构象决定的，因此，研究蛋白质的结构和空间构象与生物功能的关系成为现代分子生物学的重要课题。

7.6.1　蛋白质的一级结构和空间构象与功能的关系

我国的科技工作者人工合成胰岛素后，应用分辨率为 1.8Å（0.18nm）的 X-射线衍射装置测定了胰岛素的空间结构，还比较了各种哺乳动物、鸟类和鱼类等胰岛素的一级结构与空间构象。胰岛素都是含有 51 个氨基酸，由 A 链和 B 链二个肽链组成，A 链较紧缩而被 B 链部分包围，借二硫键将 A 链和 B 链牢固地联结在一起，其残基上的非极性侧链在内部，形成一疏水区，而极性侧链基团都分布

在分子表面,这些因素对稳定的高级构象起着重要作用。在晶体中两个胰岛素分子形成二聚体形式,当锌离子存在时,每两个锌离子外面包围着六个胰岛素分子。

由上可知,从不同动物中取得的胰岛素,其空间结构可能大致上相同。同时发现51个氨基酸中有24个氨基酸为不同种属来源的胰岛素所共有,排列顺序大体上相同,仅稍有差异,而A链和B链中的6个半胱氨酸残基所处的位置是始终不变,三对二硫键维持着A、B键间共同连接的方式。因此,可以认为:不同动物胰岛素的24个共有氨基酸残基和其大致上相同的空间构象,是决定各胰岛素具有相似生物活性和功能的因素。若动物缺乏胰岛素便会患糖尿病及伴生的有关疾病。不同动物种属来源的胰岛素中存在稍有残基排列顺序上差异是处于A链的8、9、10和B链的30位置残基之不同引起的,见表7-1。虽然这种差异对胰岛素的生物活性并不起决定性的作用,但可作为分辨种属来源的初步依据。

表7-1 不同哺乳动物的胰岛素中的氨基酸差异

胰岛素来源	氨基酸排列顺序的差异			
	A_8	A_9	A_{10}	B_{30}
人	Thr	Ser	Ile	Thr
猪	Thr	Ser	Ile	Ala
牛	Ala	Ser	Val	Ala
狗	Thr	Ser	Ile	Ala
山羊	Ala	Gly	Val	Ala
马	Ala	Gly	Val	Ala
象	Thr	Gly	Val	Thr
抹香鲸	Thr	Ser	Ile	Ala
兔	Thr	Ser	Ile	Ser

对动物、植物、真菌、细菌等近一百个生物种属的细胞色素c的一级结构进行了测定和比较,结果表明,具有同功能的蛋白质在结构上会呈现相似性,而亲缘关系越近,其结构越相似,并且与功能密切有关的氨基酸顺序都有相同之处,即相对分子质量约13000左右的

细胞色素 c 是由 104 个氨基酸组成，其中与功能密切相关的 35 个氨基酸是各种生物所共有，尤其是第 14 和 17 位的两个半胱氨酸，18 位的组氨酸和 80 位的甲硫氨酸以及 48 位酪氨酸和 59 位色氨酸在顺序中位置都不变，这些都是决定细胞色素 c 功能的关键部位。

据研究证明，上述蛋白质肽链上第 14 和 17 位上两个半胱氨酸是与血红素共价联接的位置。48 位酪氨酸和 59 位色氨酸与血红素上一个丙酸基以氢键相连，血红素上铁原子的六个配位价，除了四个与卟啉环的四个氮原子以配位键相连外，另外两个是分别与 18 位组氨酸咪唑环上的氮原子及 80 位的甲硫氨酸的硫原子配位相连。又经比较发现，亲缘关系较近的人和猩猩，他们的细胞色素 c 组成 104 个氨基酸残基的种类，排列顺序和三级结构大体上相同；而人与马相比，则有 92 个残基相同；与鸡相比，只有 91 个残基相同；与昆虫相比，仅有 77 个残基相同；人与酵母相比，竟有 64 个氨基酸相同；亲缘关系越远，其结构上的差异程度越大(见表 7-2)。因而，借细胞色素 c 在结构上的差异程度可以推定所属的种类，并提供生物进化研究所需的信息。

表 7-2　对比人的细胞色素 c 组成，不同生物的氨基酸差异数

生物名称	和人不同的氨基酸数目	生物名称	和人不同的氨基酸数目
黑猩猩	0	响尾蛇	14
恒河猴	1	海龟	15
兔	9	金枪鱼	21
袋鼠	10	狗鱼	23
牛、猪、羊	10	小蝇	25
狗	11	蛾	31
驴	11	小麦	35
马	12	粗糙链孢霉	43
鸡、火鸡	13	酵母菌	44

值得注意，蛋白质的构象并非固定不变，7.5.2 节所述的变构(或称别构)现象正是较好的例子，这是蛋白质表现其生物功能时的

一种相当普遍而又十分重要的现象。由两个 α 亚基和两个 β 亚基组成四聚体的无氧结合血红蛋白,起始与氧的亲合力很弱,而当氧和血红蛋白中一个亚基上的血红素铁结合后,立即引起该亚基的构象发生改变,亦牵动其余三个亚基相继发生变化,最终整个血红蛋白的构象改变而活化,使所有亚基血红素上铁原子的处境都易于与氧结合,所以血红蛋白与氧结合会产生"变构自催化效应"而加快与氧结合的速度。

如果具有特定结构而表现其特定功能的蛋白质在生理活动的新陈代谢过程中,由于某种或某些因素影响而引起结构的变化,只要个别氨基酸或空间构象的变化,便能引起该蛋白质的生理活性改变或功能丧失。假定蛋白质的某种变异是不利于机体正常的生理活动而机体又不能在新陈代谢中排掉它,则会导致病症。所谓变异是指因氨基酸组成和排列顺序的改变;而蛋白质内部次级键的破坏造成空间构象的改变称变性。引起变异的因素是蛋白质在翻译复制的合成过程中出现的缺陷或某种病毒攻击而造成的病灶;引起变性的因素是多种多样的,有紫外线照射等物理因素,有尿、胍、烈性去垢剂和一些有机溶剂等化学因素。不同蛋白质对变性因素的敏感性各不相同。有的蛋白质之构象和功能相当稳定,甚至有的蛋白质之生理活性更趋于活泼。在很多情况下,高级结构松散的变性蛋白质在排除变性因素后能慢慢地恢复原有构象和正常的生理活性。

7.6.2 肌纤维结构与功能

肌纤维是脊椎动物蛋白质的高级结构肌原纤维组成的,外有一层称为肌纤膜的电兴奋膜所包围。从光学显微镜中发现每根肌原纤维在纵向呈现出重复结构而形成一束接一束的肌小节。肌小节长度为2300nm,其外观有几条明显的区带,光密度较小的区带称 I 带,其中央出现一条较暗区段;光密度较大的区称 A 带,A 带中央区域比其它区域明亮称 H 区,H 区中央又有一条较深暗区段称 M 段。图7-16 显示了肌纤维结构简图。



图 7-16　肌肉组织内肌纤维结构

肌肉收缩时 I 带与 I 带距离缩小，A 带与 A 带(未画出)距离也相应缩小

从肌小节各区带横截面观察得知，I 带是直径约 7.0nm 的细肌丝，排布有些混乱，H 带是直径约为 15.0nm 的粗肌丝，按六角形排布。A 带中深暗的 C 区是细肌丝和粗肌交错衔接而排列成有规则聚集的区带，这个区带中的细肌丝和粗肌丝可在肌肉收缩和松展过程时作相对滑动。

现已发现，细肌丝主要是由三种蛋白质组成的，其基本结构是相对分子质量 Mr 为 42000 的肌动蛋白排布而成的双股螺旋。该双股肌动蛋白的每一圈螺旋内含有约 14 个肌动蛋白分子和置于肌动蛋白螺旋沟中的 2 个长度为 40.0nm 的丝状原肌球蛋白分子，肌动蛋白丝每一圈螺旋中还结合有 Mr＝79000 的 2 个肌钙蛋白分子，每个肌钙蛋白分子是由三种亚基（TnC、18000，能与 Ca^{2+} 结合；TnI、24000，能与肌动蛋白结合；TnT、37000，可与原肌球蛋白结合。）构成的络合物。粗肌丝由肌球蛋白大分子组成的，肌球蛋白由 2 条 Mr＝200000 的相同重链和 4 条 Mr＝20000 的轻链组成。轻链和大部分重链构成此大分子的两个相同的球形头部，部分重链所形成的两条很长的 α-螺旋互相缠绕，形成长度为 135.0nm 的双股 α-螺旋并卷曲的构象，构成此大分子的尾部，其中约有 80.0nm 长度与其它肌球蛋白大分子尾部卷曲在一起呈现束状，形成粗肌丝骨架，其余部分似长颈般使球形头部从粗肌丝的束内伸展出来。这种高级结构（图 7-17）是与肌肉组织在运动中具有收缩态⇌松弛态的滑动功能相适应的。

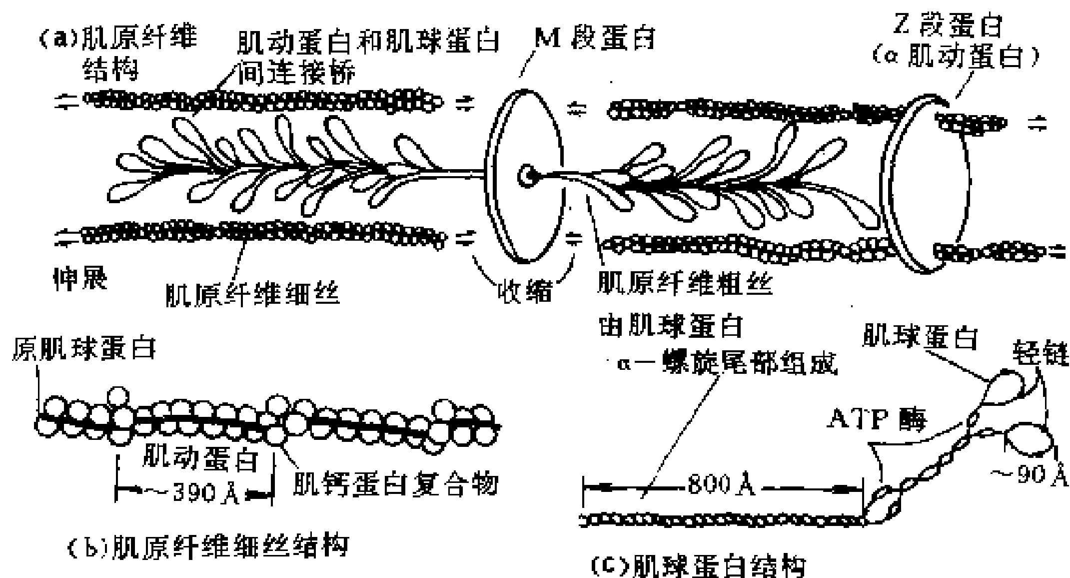


图 7-17　肌原纤维结构示意

肌球蛋白头部基团能催化 ATP 水解释放能量,从而驱动肌动蛋白与肌球蛋白球形头部基团的连接桥解开,并作功以利于肌肉的伸展和收缩。连接桥的解开和重新排布的建立是可以周期性地进行,提供了肌肉收缩和舒展等交替运动的条件。缺乏 ATP 的供应时将会使肌肉处于较僵的收缩状态,运动中软组织便感疼痛。中医的热磁理疗,有利于含顺磁铁原子血红素的蛋白质(如血红蛋白和线粒体细胞色素等)生理活性提高,有利于糖类、脂类等在代谢的氧化过程中合成 ATP,从而促进肌肉等在运动中发挥其功能。

当神经冲动传递到肌肉时,会促使肌肉细胞的 Ca^{2+} 贮藏处肌浆网膜(即内质网)释放 Ca^{2+} 进入肌纤维外面的肌浆内,而所释放的 Ca^{2+} 与细肌丝上的肌钙蛋白复合物结合,导致原肌球蛋白的结构发生变化,使肌球蛋白更易与肌动蛋白上的连接部位靠近,引起了肌肉收缩过程。所以肌钙蛋白配合原肌球蛋白在肌肉收缩中起着调控作用。

7.6.3　蛋白质结构对辅基的功能影响

经研究发现,蛋白质分子复合体内一种辅基在与周围不同类肽

链的作用下其功能可以呈现很大程度的差异。具有代表性的例子是肌红蛋白、细胞线粒体内细胞色素 c 和光合细菌内二聚体细胞色素 c′。在肌红蛋白中含有血红素上的铁能可逆地与氧结合，但自身却不会被氧化而失去提供氧的功能，这是由于在它的周围肽链上残基和存在的特殊酶系的作用使它回复到原 Fe^{2+} 状态所致。

线粒体内的细胞色素 c 也是含有血红素的蛋白质，该分子中有 104 个氨基酸残基，既有呈现 α-螺旋也有呈伸展肽链的区域。血红素辅基(见图 7-18)以原血红素Ⅸ的乙烯基与蛋白质分子中 2 个氨基酸侧链作用，形成的硫醚键与多肽主链以共价结合。细胞色素 c 中血红素上与四个氮结合的铁尚与多肽内残基组氨酸侧链咪唑基团上的氮原子和甲硫氨酸上的硫原子形成 2 个配位键(肌红蛋白不存在 Fe←S 配位键，它空着第 6 个键才能与氧结合)。于是细胞色素 c 的主要功能是在线粒体的电子传递链内成为一个电子传递体，其中铁在两种氧化状态($Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + e$)间可逆地进行氧化和还原。肽链和血红素辅基间的共价作用调节了 Fe^{2+} 的电动势，并给予血红素适当地定向，从而使电子能跃经离域的卟啉轨道系统的外露表面边缘进行传递。

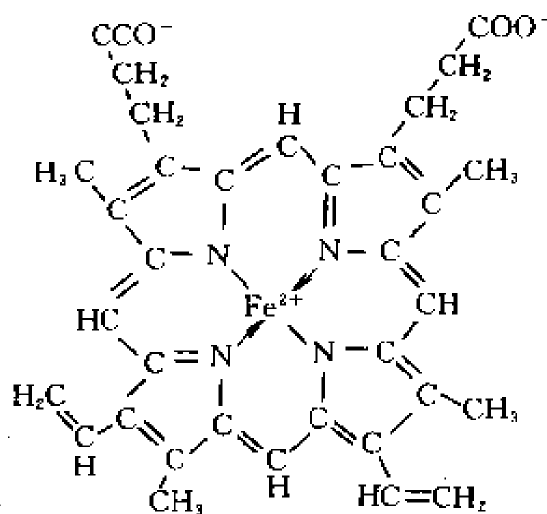


图 7-18　原卟啉Ⅸ与 Fe^{2+} 组成的血红素辅基

光合细菌内细胞色素 c′是亚基二聚体结构，每个亚基主要含有 4 个 α-螺旋结构域，亚基的聚集使 2 个血红素亚基在同一侧面接近，每个血红素可传递 1 个电子，则细胞色素 c′分子可同时传递 2 个电子给具有生理功能的受体分子。

由上数例可见，很多含血红素辅基的不同蛋白质种类却可呈现不相同的功能，表明各种肽链和相同血红素辅基间所发生的各自独

特作用方式会使这些分子在整体上具有不同的功能特性，亦可以说蛋白质结构影响着辅基的功能。

7.6.4 蛋白质进化过程中的突变与基团剪接

研究蛋白质结构与功能关系时发现，在不同的生命机体中，那些具有相似或相同生物功能的蛋白质在氨基酸顺序和三级结构方面也明显地呈现出相似性。人们可以认为，这些是由趋异进化过程所形成的具有亲缘关系的分子，它们可能是由于编码蛋白质的 DNA 遭受突变，使祖先分子逐渐连续地进行选择性修饰并稳定下来的结果。

例如，细胞色素 c 分子家族是研究范围最广的一类，它在多细胞机体内呈现出线粒体电子传递链中的电子传递体功能。如果将人和绿色植物等不同机体中线粒体细胞色素 c 进行顺序研究和比较，即可看到在顺序中有些位点是完全可变的，其它的基本上是恒定的，有一个特殊的顺序保守区域，这些恒定的氨基酸残基中有的能与具有重要功能的血红素相互作用而决定其功能的专一性，其余的那些对于调节控制细胞色素 c 与其生理过程的氧化酶及还原酶的反应也都具有重要作用。

从发现各种机体线粒体细胞色素 c 分子内有一特殊的顺序保守区域推定：在多细胞生物体出现前线粒体细胞色素 c 的顺序和结构已高度完善，这表明它的进化始祖必定存在于原核生物体中。所以能有效地利用氧化或光合的电子传递链，合成高能中间物三磷酸腺苷(ATP)之原核生物的蛋白质，均含与线粒体细胞色素 c 极为相似的分子。

原核生物的那些与蛋白质辅基血红素一起发挥重要功能的氨基酸残基表现出很强的顺序和结构上保守性，显示它们的基本结构主体决定功能之重要部位的变化是微小的，使分子的专一性功能在不同生物体中都充分表现出来，然而，它们与高等生物或线粒体中细胞色素 c 相比，在相当多的顺序上出现差异，即含多个氨基酸的插入或缺失，不过所有变化都是在基本结构主体上的其它部位。

在结构和功能上具有亲缘关系的族系，如丝氨酸蛋白酶族系、脱

氢酶系和氧合珠蛋白系等，在进化过程中经过了基本结构排布的修饰，于是在某特定族系中各个别成员在顺序和结构上发生差异而出现分子功能性质上的多样化，对不同结构的底物分子的催化反应呈现不同的专一性。例如所有丝氨酸蛋白酶族系的成员都能催化肽链的水解，但这个分子家族的不同成员在肽链上的裂解部位却不相同，这是由靠近裂解部位的近邻氨基酸侧链的性质所决定的。

由以上的情况可知，趋近进化过程一般会使蛋白质功能逐渐发生改变，然而在许多情况下，例如机体遭受某种刺激或病毒等袭击，蛋白质分子发生突变却能根本改变其功能。这种突变往往可能会使合成出来的蛋白质分子在功能上不完全或造成缺陷，这也是引起遗传疾病的一种原因。这种突变也有可能在相互有关的蛋白质中因氨基酸发生取代或合成出结构重新排布的蛋白质而获得新功能。一个共同的蛋白质祖先分子经较轻微的修饰后，可选择地出现在功能上完全不同的分子。此外，也有可能存在蛋白质活性部位上表现出趋同进化的这种情况，顺序和结构根本不同的两种分子却在功能上相似之例，是丝氨酸蛋白酶系中许多成员与枯草杆菌所产生的一种丝氨酸蛋白酶（名叫枯草杆菌蛋白酶），在它们的顺序和三级结构上完全不同而在活性发挥蛋白质催化功能的部位上氨基酸残基的特定排布却基本相同。

蛋白质的功能进化，包含有编码蛋白质的 DNA 各个点突变在进化过程中选择性地固定和 DNA 大规模的重排。相对地说，任何新突变的固定都是偶尔发生的过程，其通常结果仍是逐渐进化。不过，高等生物重要的防御机制之一的免疫反应，却基本上依赖免疫球蛋白这种异常分子的迅速产生，从而能识别和结合外来可能对生物体有害的物质并加以清除，人们利用了这一机制制造了牛痘苗、卡介疫苗、小儿麻痹症疫苗等等，即预先激发生物体所产生的专一性免疫球蛋白，以分别清除而预防此类病毒或细菌的侵袭，具有不同专一性的免疫球蛋白均有一显著的特性，即它能迅速地突变、基因剪接和 RNA 剪接来改变蛋白质分子某些结构域中可变区域的顺序和构象，

从而构成免疫球蛋白分子与引起免疫反应的外来物质相结合的部位。这种突变结果使生物具有这样一种能力，能生产出数量巨大的各种各样的抗体——免疫蛋白。在这方面，我国的微生物学和免疫学先驱程慕颐教授曾经做了大量的研究工作，并与生产相结合，生产了不少制品，为我国人们的健康事业作出了重大的贡献。

进化过程的发生，可以认为是由于编码蛋白质的 DNA 上之个别点突变经过连续的选择而主使的。进而从许多蛋白质结构特性来说，已知蛋白质结构中的片段内常含有结构相似的结构域之多重拷贝，这种结构特性说明是通过基因剪接过程产生的。在许多情况下，蛋白质分子的产生过程可能是一个特定结构的结构域之编码基因以多拷贝形式先剪接在一起，然后剪接好的基因组各处发生突变且基本上独立地固定下来，这过程的最终结果是蛋白质由顺序不同而结构相似的重复结构域所组成的。人们也发现，某些很大的蛋白质是由几个不同结构的结构域组成，每个结构域也都能各自在结构上组建成其它已知蛋白质的某个部分或整体。例如糖酵解酶中的丙酮酸激酶大蛋白质是由 3 个结构域组建成的(见图 7-19)，其中 2 个结构

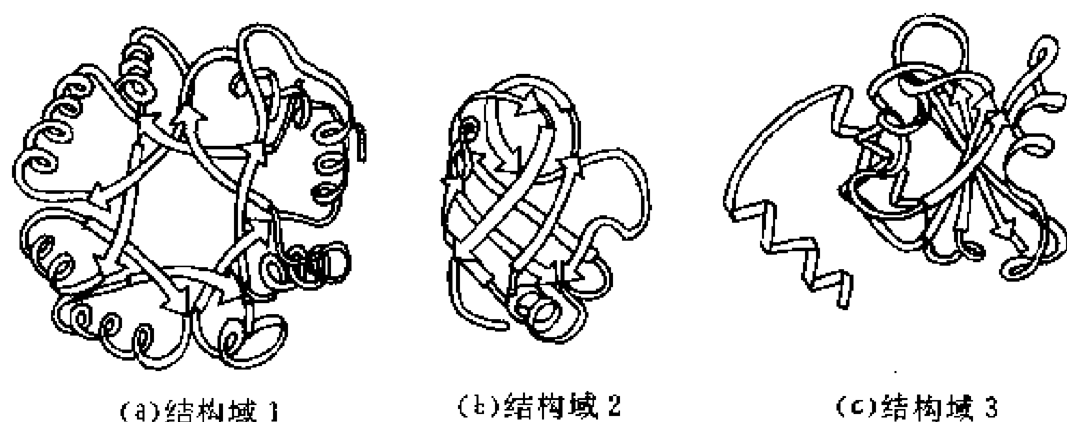


图 7-19　丙酮酸激酶的结构域 1、2 和 3 在结构上毫不相似的图解

域——结构域 1 和结构域 3，分别在结构上与丙酮磷酸异构酶的 β-圆筒及许多脱氢酶中普遍存在的扭曲 β-折叠区域相似。从而启迪了基因剪接技术及其生物工程的研究上升到一新的认识水平。因此，

基因剪接技术和细胞融合技术都已成为当前分子生物学家的前沿高科技课题。

7.7 蛋白质的性质

蛋白质是由多种氨基酸以大数量组成的多肽分子，它成为具有高级结构的大分子。于是它既呈现出某些氨基酸与多肽性质，又具有氨基酸与小分子所没有的特点。

7.7.1 蛋白质的一般理化性质

(一)蛋白质的酸碱解离性质

由于蛋白质分子中含有多种可解离的基团，如 N-末端氨基、C-末端 α-羧基以及各种氨基酸残基上可解离的侧链基团，它们具有各自特征的解离常数(K 或 pK)，在不同的 pH 条件下解离成带正电或带负电的基团。然而，蛋白质整体表现的解离现象(pK 值)与游离氨基酸解离基团的解离(pK 值)是不完全相同的，蛋白质中的解离基团可能受到邻近荷电基团、微环境和部分解离基团因肽链盘曲而包藏在蛋白质分子内部或参与形成氢键等影响，还有某种原因引起蛋白质变性后之解离性质与天然蛋白质的也有可能不同。蛋白质是可以解离成多价离子的两性电解质，它们荷电的性质与多少是由含有的解离基团的种类与性质以及介质环境和 pH 决定的。在特定条件下，带电性质不同的各种蛋白质可以在电场中分别向正、负电极方向或快或慢地迁移泳动。利用蛋白质的这种性质可成为设计电泳分离和纯化基础。

对每一特定蛋白质都可找到一特定的 pH 值，使它带有的正电荷总和等于所带有负电荷的总和，这一 pH 就是该蛋白质的等电点(以 pI 表示)。在 pI 条件下，蛋白质在电场中不发生泳动，其溶解度也最小。在中性盐存在的溶液中蛋白质的等电点往往会发生明显的改变。一些中性盐的相应离子如 Ca^{2+}、Mg^{2+}、HPO_4^{2-} 和 Cl^- 等能与蛋白质上的某些解离基团结合，所以蛋白质的实际等电点还与介质

内离子组成有关。因此，在这种情况下蛋白质的等电点，与没有中性盐等影响条件下该蛋白质的等离子点不同，等离子点是蛋白质仅由于本身解离而呈现其所带的正负电荷数目相等时的 pH 值，此时蛋白质带有相等数量结合质子的碱性基团与脱去质子的酸性基团。可以认为，等离子点是各种蛋白质解离性质的特征常数。

(二)蛋白质的溶解性质及其分类

根据化学组成可将蛋白质分为两大类，一类是不含其它非蛋白质成分的纯肽链所组成；另一类称为结合蛋白质，它是蛋白质肽链和非蛋白质物质结合的络合物，例如核蛋白质(核酸与肽链结合形成的)、糖蛋白(糖类物质与肽链结合形成的)、脂蛋白(是肽链与脂类物质结合形成的)、磷蛋白(是与磷化合物类结合形成的)等。

纯肽链蛋白质除了头尾末端的 N-α-氨基和 C-α-羧基外，有的还含大量极性侧链而具有亲水性，易溶于水、稀盐水溶液、稀酸或稀碱水溶液等。有的蛋白质含大量非极性侧链或大量脯氨酸、羟脯氨酸而一般不溶于水溶液。表 7-3 和表 7-4 列出蛋白质按其化学组成及纯肽链溶解性质的粗略分类。

表 7-3 蛋白质按组成粗略分类

按化学组成分类	举　例	非蛋白质成分
纯肽链蛋白	血清清蛋白、乳清蛋白	无
结合蛋白		
核蛋白	病毒核蛋白、染色体蛋白	核酸
糖蛋白	免疫球蛋白、粘蛋白、多糖蛋白	糖类
脂蛋白	低密度脂蛋白、高密度脂蛋白	各种脂类
磷蛋白	酪蛋白、卵黄磷蛋白	磷酸
色蛋白	血红蛋白、黄素蛋白	色素
金属蛋白	铁蛋白、铜蓝蛋白	金属离子

表 7-4　纯肽链蛋白按溶解性质粗略分类

按溶解性质分类	举　例	溶解性质
清蛋白	血清清蛋白、乳清蛋白	溶于水和中性盐溶液，不溶于饱和硫酸铵溶液。
精蛋白	鱼精蛋白	溶于水、稀酸、稀碱、稀氨水。
组蛋白	胸腺组蛋白	溶于水、稀酸、稀碱，不溶于稀氨水。
球蛋白	免疫球蛋白、纤维蛋白元、卵粘蛋白	不溶于水，溶于稀中性盐溶液，不溶于半饱和硫酸铵溶液。
谷蛋白	米谷蛋白、麦谷蛋白	不溶于水、中性盐溶液及乙醇，溶于稀酸或稀碱。
醇溶谷蛋白	醇溶谷蛋白、醇溶玉米蛋白	不溶于水、中性盐溶液，溶于70%～80%乙醇。
硬蛋白	角蛋白、胶原蛋白、弹性蛋白	不溶于水、稀中性盐溶液、稀酸、稀碱和一般有机溶剂。

清蛋白和球蛋白在低浓度的中性盐溶液条件下，它们的溶解度随离子强度 $I(=\frac{1}{2}\sum m_i z_i^2$；$m_i$ 是 i 离子质量摩尔浓度，z_i 为 i 离子所带电荷）升高而增大，中性盐浓度继续升高而超过某一上限时，它们的溶解度反会随离子强度升高而降低，最后形成沉淀析出（即盐析）。

（三）蛋白质胶体溶液的一般性质

多数蛋白质都是由数以百计的氨基酸组成的，其相对分子质量都在 10000 以上，有的可达 1×10^7，最大的如烟草花叶病毒，含 2130 个亚基，约有 4×10^4 个氨基酸，相对分子质量达 4×10^7。最小的蛋白质如胰岛素也有 51 个氨基酸，相对分子质量为 6000 左右。所以蛋白质大分子具有一定空间结构和形状，有的约呈球形，有的为椭圆体，还有的成纺锤体或纤维状。多数蛋白质颗粒直径分布是在 1～100nm 范围，达到了胶体颗粒的大小。将它们分散到溶液中可制得具有胶体性质的胶体溶液，由于许多蛋白质分子的表面分布着大量氨基酸残基的极性侧链基团，在溶液中能和水作用形成水合分子而

表现为亲水胶体。这类蛋白质胶体溶液借助于蛋白质分子的水合层和蛋白质所带相同电荷的排斥作用,通常使胶体相当稳定地分散在介质之中。倘若让蛋白质分子处于等电点状态并因盐析而脱水时,蛋白质便会凝集而析出。

由于蛋白质分子在溶液中具有较高的水合作用,导致该溶液呈现出较高的粘度,其粘度随蛋白质水合容积增大和分子不对称性与伸展程度的增加而升高。在溶液中的蛋白质水合分子是不能透过半透膜扩散的,根据蛋白质分子的半透膜不透性,可应用透析方法进行脱盐、浓缩和更换溶剂系统等。

(四)紫外吸收性质

蛋白质分子含有 Tyr、Trp 以及 Phe 时就会在 280nm 对紫外光有最大的特征吸收,不同的蛋白质可能发生一些差异。带有核酸的肽链在 260nm 处具有的特征吸收可能也产生干扰。上述蛋白质对紫外光的特征吸收性质,可作为紫外吸收法测量蛋白质浓度的方法。

$$\text{蛋白质浓度(mg/ml)} = 1.55A_{280}^{1cm} - 0.76A_{260}^{1cm} \qquad (7.7\text{-}1)$$

(测定范围:0.1~0.5mg/ml)

肽链骨架本身的肽键也会引起蛋白质具有在 200~215nm 处的紫外光吸收值的吸收性质,它还伴有 225nm 处的较弱吸收,利用这种光吸收性能也可测定蛋白质的浓度,其计算式为

$$\text{蛋白质浓度(mg/ml)} = 144(A_{215}^{1cm} - A_{225}^{1cm}) \qquad (7.7\text{-}2)$$

(测定范围:0.01~0.1mg/ml)

值得注意,蛋白质最大特征吸收处波长的紫外光,可能最易激励蛋白质的反应活泼性,导致变性、凝聚或产生色斑等对皮肤的伤害,因此,需要采取防范措施来减少紫外光的照射。

7.7.2 蛋白质胶体溶液一些与流体力学有关的性质

(一)粘滞度与浓度或体积分数以及形状关系

蛋白质在溶液中的形态往往呈卷曲椭圆体或近球形等微粒,它们通常会有一定的对称性,于是可在光学或电子显微镜下观察并取其投影面积的对等分线长度作为粒子大小的参数,常称之为"相当直

径"(或 Martin"直径"),简便的方法是用一系列大小不同的圆圈刻在透明的标尺滑片上对比以测得"相当直径"。对于很不对称的不规则微粒,可简略地视为椭球三维体,以 a 表示沿微粒旋转轴测得的椭球体半径,用 b 表示测得的等分椭球体的圆面半径。a/b 称椭球体的轴比,常用于衡量对球体(a/b=1)微粒的偏离情况。a>b 时微粒呈蛋形或长椭球体;a<b 时,微粒似扁球形或铁饼形;当 a≫b 时,即变成棒状;若 a≪b 时则变成圆盘状。用双参数(a,b)可更好地描述微粒大小、形状和它们的对称性。

蛋白质微粒在液体中受到流体层流的力会朝同一方向以一定的速度移动,若微粒不转动,则流体的运动速度遭到微粒的阻拦而减慢,表现出该溶液的粘度增加;如果流体层中存在具有旋转性的微粒,引起流体运动的部分能量还用于该微粒的旋转,使流体的运动速度更加缓慢。经验证明,粘滞系数(或粘度)η 与微粒浓度 c 的关系为

$$\eta=\eta_0+\alpha c+\beta c^2+\cdots \tag{7.7-3}$$

粘度被定义为让流体以单位速度梯度的差异发生层流时,在流体层单位面积上所必需施加的推动力。

式中 η_0 ——代表纯介质的粘度;

α、β ——代表与微粒大小、形状和定向性有关的系数。

根据牛顿流的两点假设(同一流层内微粒间不相互作用和微粒大小与形状不因流动而发生絮凝或分裂等变化),运用流体力学连续方程和动态方程,导出泊肃叶定律,其简化公式是

$$t=常数\frac{\eta}{\rho} \tag{7.7-4}$$

式中 t ——代表流过规定体积的时间(秒);

ρ ——代表该溶液的密度;

η ——代表该溶液流体力学性质之一粘度;

常数项 ——代表操作仪器特征和条件的所有参数。

又根据 Einstein 粘度定律得出的相对粘度与极稀分散体系中分散相

的体积分数 ϕ 的关系式：

$$\eta/\eta_0 = 1 + 2.5\phi + K_1\phi^2 + \cdots \tag{7.7-5}$$

当 ϕ 远小于 0.1 时，可以略去上式的较高次项。若重排成比浓粘度，则(7.7-5)式可变为

$$\frac{(\eta/\eta_0) - 1}{\phi} = 2.5 + K_1\phi + \cdots \tag{7.7-6}$$

此式在 $c \to 0$ 时的极限值为$[\eta]$，称特性粘度。微粒的溶剂化、分散情况（"相当直径"）、形状的不规则和轴比率与对称性都会对上式产生影响而造成偏差。

(二)溶剂化影响

在分散体系中，胶体微粒所占有体积会受溶剂化的影响，一般体积分数公式需以下式表示：

$$\phi_2 = \frac{n_2\overline{V}_2}{n_1\overline{V}_1 + n_2\overline{V}_2} \tag{7.7-7}$$

式中　$n_2\overline{V}_2$——代表胶体微粒的 n_2 摩尔与偏摩尔体积之乘积，即在分散介质 1 中加入 2 组分胶粒而引起分散体系内总体积的变化值。

对于 $\overline{V}_2 \gg \overline{V}_1$，即在无限稀($n_2 \ll n_1$)的情况下才能将上式近似地简化为

$$\phi_2 \approx \frac{n_2\overline{V}_2}{n_1\overline{V}_1} \approx \frac{\overline{V}_2}{\overline{V}_1}X_2 \approx \frac{\overline{V}_2}{M_2}c_2 \tag{7.7-8}$$

式中　c_2——代表单位体积中含微粒质量值；

X_2——代表微粒的摩尔分数。

当分散相与分散介质的偏摩尔体积接近时，$\phi_2 \approx X_2$。一般情况是 $\overline{V}_2 \gg \overline{V}_1$，则 $X_2 \ll \phi_2$。若将(7.7-8)式概括为

$$\phi = K(\text{浓度}) \tag{7.7-9}$$

于是用不同浓度单位其 K 值便有不同的表示法(见表 7-5)。

假定溶剂化发生在胶粒的表面上，溶剂化量势必正比于胶粒的比表面 $A_{SP}\left(=\frac{A_2}{m_2}=\frac{3}{\rho_2 R}\right)$，所以溶剂化微粒体积 $V_{溶剂化}$是微粒体积与

结合于表面的溶剂体积之和，即

$$V_{溶剂化}=V_2+\frac{3}{\rho_2 R}\times m_2\Delta R=V_2(1+\frac{3\Delta R}{R}) \tag{7.7-10}$$

而

$$\phi_{溶剂化}=(1+\frac{3\Delta R}{R})\phi_{干} \tag{7.7-11}$$

式中 $(1+\frac{3\Delta R}{R})$——代表表面溶剂化的“增加系数”。

表 7-5 在 $\phi=K$(浓度)式中比例常数 K 值与浓度关系

浓 度	K	符号的定义	适用条件
重量分数 m_2/m_1	ρ_1/ρ_2	m_i = i 组分的克数 ρ_i = i 组分的密度	无溶剂化微粒，无限稀释
摩尔分数 n_2/n_1	$\overline{V}_2/\overline{V}_1$	$\overline{V}_i$ = i 组分偏摩尔体积	无限稀释
每单位体积中重量 c	$\overline{V}_2/M_2$	M_i = i 组分相对分子质量或相对粒子质量	无限稀释
未溶剂化的体积分数 $\phi_干$	$1+(3\Delta R/R)$	R = 胶粒球半径 ΔR = 溶剂化的厚度	球形微粒仅在表面上溶剂化
未溶剂化的体积分数 $\phi_干$	$1+\frac{m_{1,b}}{m_2}(\rho_2/\rho_1)$	$m_{1,b}$ = 结合的溶剂质量	正比于微粒质量的溶剂化

关于亲液胶体，它的分子上许多部位都能溶剂化而不仅是表面，则胶体的整个体积(或总质量)决定着溶剂化的程度，不过，溶剂化胶粒的体积仍然等于未溶剂化胶粒体积 V_2 与结合的溶剂分子体积 $V_{1,b}$ 之和，即

$$V_2+V_{1,b}=V_2(1+\frac{V_{1,b}}{V_2})=V_2[1+\frac{m_{1,b}}{m_2}(\rho_2/\rho_1)] \tag{7.7-12}$$

上式是假设结合的溶剂密度与自由溶剂的相同。因而该溶剂化引起的效应是

$$\phi_{溶剂化}=[1+\frac{m_{1,b}}{m_2}(\rho_2/\rho_1)]\phi_{干} \qquad (7.7\text{-}13)$$

式中 $[1+\frac{m_{1,b}}{m_2}(\rho_2/\rho_1)]$——代表全分散微粒溶剂化的“增加系数”。

(7.7-11)和(7.7-13)两式表达了二种不同溶剂化模型及其溶剂化与微粒大小的不同关系。第二个模型适用于蛋白质水溶液，$m_{1,b}/m_2$似乎与微粒的大小无关。由此认为，对非溶剂化微粒 $\phi_{干}$ 预计值的偏差是微粒溶剂化程度的量度。如果将这两式分别代人(7.7-5)式可得

$$\eta/\eta_0=1+2.5(1+\frac{3\Delta R}{R})\phi_{干} \qquad (7.7\text{-}14)$$

和

$$\eta/\eta_0=1+2.5[1+\frac{m_{1,b}}{m_2}(\rho_2/\rho_1)]\phi_{干} \qquad (7.7\text{-}15)$$

(7.7-14)式解释了在其它情况相同时，微粒越小，“增加系数”就越大，这是(7.7-5)式表达的 Einstein 粘滞度定律所以产生偏差的原因之一，但(7.7-14)式自身，在一定范围以外也会因微粒溶剂化层厚度达到一定程度后不可能再以同样的梯度递增而造成了偏差。微粒的椭圆度或不规则等情况也是引起(7.7-14)式产生偏差的原因之一。(7.7-15)公式说明了整个微粒的溶剂化效应，即溶剂化体积分数增加，$[(\eta/\eta_0)-1]/\phi_{干}$ 在 $c\to0$ 时的值$[\eta]$也随之增加。特性粘度$[\eta]$也可称内在粘度。此公式也解释了(7.7-5)Einstin 方程的正偏差原因。例如蛋白质微粒在未溶剂化前的密度约为 $1.34g\times cm^{-3}$。水化球蛋白胶体在 $c\to0$ 时的$[(\eta/\eta_0)-1]\phi_{干}$ 等于 $2.5[1+1.34(\frac{m_{1,b}}{m_2})]$，而球蛋白微粒的含水量是 0.60 克水/克蛋白质，则$[\eta]$是 4.51，比(7.7-5)公式预计的 2.5 大了 1.8 倍。所以粘度的测定可提供溶剂化程度的定量信息。不过，值得注意，偏差也有可能是由于微粒形状(椭圆球体等)因素引起的。

(三)非圆球微粒的影响

圆球形代表微粒的一种“极端形状模型”，通常都是根据对“极端

模型”的偏离来讨论其它形状的微粒流体力学性质。最简单的偏离是几何形状椭圆体的微粒，它们的椭圆度是以轴径比 a/b 表征。若分散微粒的形状为椭圆，那么引入的粘度理论比较复杂，微粒在层流中有定向化的可能。假定微粒小到能进行布朗运动而引起随机化超过了任何定向的倾向，微粒则随着层流不断地调整自己而翻滚运动，耗散了大量的能量，导致体系的粘度变得较大。于是 R.Simha 提出了椭球体等微粒的粘度方程为

$$[\eta]=\frac{14}{15}+\frac{(a/b)^2}{15[\ln(2a/b)-\lambda]}-\frac{(a/b)^2}{5[\ln(2a/b)-\lambda+1]} \quad (7.7\text{-}16)$$

式中　λ——代表与微粒的形态有关之参数。

若 λ=1.5，则微粒为椭圆球体；λ=1.8，微粒为圆柱形体。从[η]值可求得 a/b 轴径比值。

L.Oncley 对蛋白质溶液的不同[η]值画出等值线（见图 7-20），并在轴径比值 a/b=1.0 处指出溶剂化含水量（克水/克蛋白质）。根据图 7-20 可估计各种轴径比的扁球状和长椭球状的特性粘度[η]，并可从这些等值线的截距得知与该[η]值相对应的无水化蛋白质微粒的 a/b 比值，由此可知蛋白质溶液在一定特性粘度条件下的椭圆度和溶剂化效应。

例如等值线为[η]=8.0 时有如下几种可能性：(1)a/b=1 球形微粒，它的水合程度约 1.6 克 H_2O/克蛋白质；(2)不水合的长椭球形微粒，它的轴比约为 7；(3)不水合的扁球状微粒，它的轴比是 0.1；(4)在[η]=8.0 的等值线上其它点也有相应的 a/b 和水合情况。用不同方法制备的烟草斑纹病毒(TMV)微粒，其圆形的长/直径（即 a/b）比值是不同的，随着轴比(a/b)的增加，由 Simha 方程所作的 η/η_0 与 ϕ 呈直线关系中算出的 a/b 比值，与直接用电子显微镜观测的 TMV 微粒相吻合。然而由图 7-20 可知，任一[η]测定值所对应的整个值域内的数值都是椭圆度与溶剂化的综合表现，还不能清楚地分辨开来，因此无法由粘度计分别单独地测得。

实际上，除了上述各种 a/b 比值的椭圆体外，还有其它的构型，

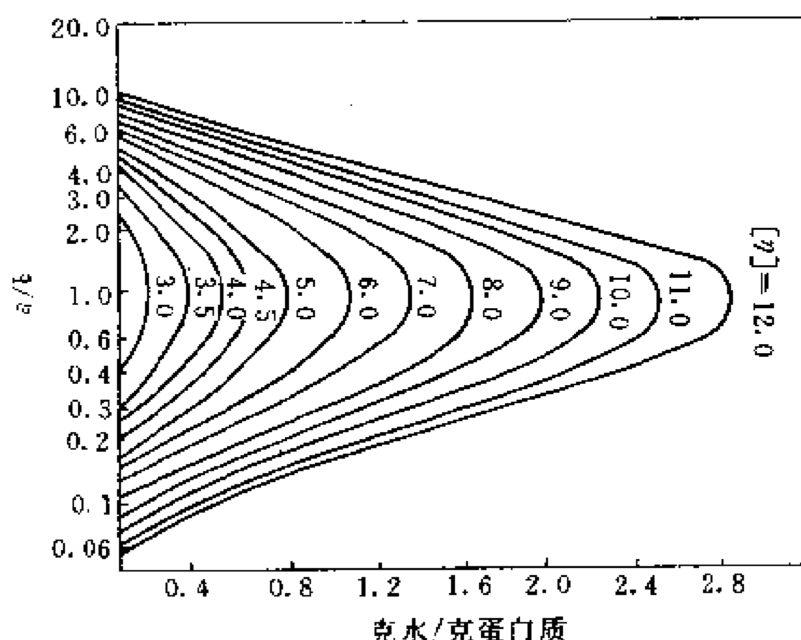


图 7-20

蛋白质水溶液的〔η〕与微粒轴比 a/b 和水合程度 $m_{1,b}/m_2$ 的关系

大分子常具有挠曲性而形成多种多样的构型，其中极为重要的是紊乱卷绕型。蛋白质分子由于部分二硫键和氢键而稍有一定的形象而多数大分子是紊乱卷绕物，在溶液中它们的长链像串珠一样，可设想成两种极端的构型：一种是长链可自由运动，或多或少地舒展，流动溶剂分子能自由地穿过串上小珠；另一种长链卷绕成紧密的乱线圈，一些溶剂分子紧附其中，成为整个单独运动的线团。大多数真实分子介于两者之间的形态。这两种极端情况已成为描述分子可能具有构型的变化范围。从公式(7.7-8)和(7.7-9)可得

$$[\eta]=\lim_{c\to 0}\frac{(\eta/\eta_0)-1}{C}=2.5\overline{V}_{SP} \qquad (7.7\text{-}17)$$

式中　$\overline{V}_{SP}$——代表该浓度下每克物质所具有的偏微体积，即分散相偏比体积。

对于完全自由舒展的分子，偏比体积等于整个分子中小串珠的数目乘以每个小珠的比体积。小珠的比体积是其密度的倒数，整条链的重量除以珠重量等于该链所含的珠数；对于不舒展的分子，$\overline{V}_{SP}$是整

个分子卷绕线团的体积除以其重量。

7.7.3 一些蛋白质的物理常数与有关特性

上述讨论的是含胶粒的流体运动情况。如果胶体微粒是在稳定态条件下的流体中运动，例如沉降或扩散，即需要用 Stokes 定律和 Fick 定律来描述。

(一)含胶粒的流体体系中之阻力系数

Stokes 利用流体力学连续方程和动态方程得出粒子对流体作功的速度公式，从而提出 Stokes 定律：

$$F=6\pi\eta Rv \tag{7.7-18}$$

微粒作用于流体的力势必引起反作用力，假定流体以正方向流动，微粒便以负方向产生阻止流动的力；若微粒以正方向移动，则流体以负方向给予阻力。(7.7-18)公式即是描述在含微粒的流体中微粒作用于流体的力 F 与阻力之关系，一般可表示为

$$F=fv \tag{7.7-19}$$

$$f=6\pi\eta R \tag{7.7-20}$$

式中 F ——代表微粒以 v 速度运动所产生的力；

f ——代表球形微粒的阻力系数。

由上式也可认为，稳定态时微粒的慢运动情况，微粒上的粘滞力(也等于 F)与微粒运动速度成正比。

如果球形微粒受重力$[F=\frac{4}{3}\pi R^3(\rho_2-\rho_1)g$，其中 ρ_1 为流体介质密度，ρ_2 为微粒密度$]$作用而产生下降运动，于是

$$\frac{4}{3}\pi R^3(\rho_2-\rho_1)g=6\pi\eta Rv \tag{7.7-21}$$

对于稳定态下微粒的沉降速度可由(7.7-21)式求得

$$v=\frac{2}{9}\frac{R^2(\rho_2-\rho_1)g}{\eta} \tag{7.7-22}$$

它适用于独立的互不干扰的球形微粒的自由沉降情况，由上式又可得微粒半径、质量和阻力系数，其分别为

$$R=[9\eta v/2(\rho_2-\rho_1)g]^{1/2} \tag{7.7-23}$$

$$m=\rho_2\frac{4}{3}\pi R^3=\frac{4}{3}\pi\rho_2[9\eta v/2(\rho_2-\rho_1)g]^{3/2} \quad (7.7\text{-}24)$$

$$f=6\pi\eta[9\eta v/2(\rho_2-\rho_1)g]^{1/2} \quad (7.7\text{-}25)$$

(7.7-21)式也是落球式粘度计的基础。

实际上，分散的微粒形状往往是多样的，由于胶体微粒在沉降中翻滚，形成似球形的"相当球体"，由(7.7-23)等式求得的 R 是"相当球体"半径 $\overline{R}$，m 是"相当球体"的质量 $\overline{m}$。f 是"相当球体"的阻力系数，即

$$f=6\pi\eta\overline{R} \quad (7.7\text{-}26)$$

若把真正球体的阻力改为 f_o，则

$$f_o=6\pi\eta R \quad (7.7\text{-}27)$$

当 $\overline{R}>R$ 时，$f>f_o$。因此，可以利用 f/f_o 比值来描述溶剂化或椭圆性的程度。对于任一形状的溶剂化微粒，若使用了未溶剂化微粒的密度，或者对于未溶剂化的椭圆微粒，用了"相当球体"的公式，在沉降和扩散实验结果的计算中，所得微粒质量会偏低。

(二)含胶粒的流体体系中之扩散系数和沉降系数

如果有二个含胶粒不同浓度($c_2>c_1$)的流体放置在一起，根据热力学第二定律，流体内质点在运动中将受到驱使力，促使各种质点自发扩散而均匀地分布，流体内质点分布越混乱均一，其熵值越大。若设想无外力场的影响下，用多孔无厚度隔板分开二不同浓度的流体，分散相质点便会从 c_2 流体处向 c_1 流体发生自发扩散，Fick 第一定律指出，通过边界单位截面积的质点扩散速度(通量 J)与该处的质点浓度梯度$\frac{\partial c}{\partial x}$成正比，即

$$J=D\frac{\partial c}{\partial x} \quad (7.7\text{-}28)$$

式中 D——代表溶液质点在迁移过程中的扩散系数，它不同于动量流和速度关系的比例常数 η(粘滞系数)。

假设浓度变化发生在横截面 A 而厚度为 Δx 的范围内，那么单位厚度的此范围之浓度梯度的变化是正比于浓度变化的速度，即

$$D\frac{\left[\left(\frac{\partial c}{\partial x}\right)_{x=0}-\left(\frac{\partial c}{\partial x}\right)_{x=\Delta x}\right]}{\Delta x}=\frac{\Delta c}{\Delta t} \quad (7.7\text{-}29)$$

若上述整个区域内浓度是无限小连续地改变，D 即与浓度微小变化无关，可作为常数，于是

$$\frac{\partial c}{\partial t}=D\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (7.7\text{-}30)$$

这就是 Fick 第二定律表达式。通过在不同时间测定某一部位上的扩散微粒浓度，就可作图求出扩散系数 D。对于胶体微粒的 D 有 $10^{-7}cm^2s^{-1}$数量级，微粒的 D 与球体的半径成反比。微粒越大，D 的测定也越困难。

扩散的驱使力 $F_{扩}$ 是热力学中的化学势 μ_i，由此在稳定态条件下（$F_{扩}=F_{阻}=fv_{扩}$），可推导得

$$D=\frac{kT}{f} \quad (7.7\text{-}31)$$

式中　k——代表波兹曼常数；

　　　T——代表绝对温度。

上式表明了阻力系数 f 与扩散系数 D 间的测量关系。当微粒处于重力沉降时，$m[1-(\rho_1/\rho_2)]g=fv$，则

$$m=\frac{kTv}{D[1-(\rho_1/\rho_2)]g} \quad (7.7\text{-}32)$$

当微粒处于离心力场时，以离心加速度 ω^2R 代替重力加速度 g，在沉降与阻力的关系中可得

$$m=\frac{kTS}{D[1-(\rho_1/\rho_2)]} \quad (7.7\text{-}33)$$

式中　$S=\frac{m}{f}[1-(\rho_1/\rho_2)]$，称离心沉降系数。

（三）一些蛋白质的物理常数

综上所述可知：(1)由扩散系数和离心沉降系数（或沉降速度）能计算胶粒的质量 m；(2)从扩散系数可计算阻力系数 f；(3)无溶剂化的微粒质量除以干微粒的密度可得它的体积，对球形微粒即可计算

出半径 R;(4)应用 $f_o = 6\pi\eta R$ 能计算非溶剂化球形微粒的阻力系数 f_o;(5)采用实验测定的阻力系数 f,计算 f/f_o 的比值;(6)根据 f/f_o 比值能估计微粒的溶剂化程度。

由(7.7-13)、(7.7-26)和(7.7-27)式可知:

$$f/f_o = \frac{6\pi\eta\bar{R}}{6\pi\eta R} = \left(\frac{V_{溶剂化}}{V_{无溶剂化}}\right)^{1/3} = \left(1 + \frac{m_{1,b}\rho_2}{m_2\rho_1}\right)^{1/3} \qquad (7.7\text{-}34)$$

F. Perrin 用 f/f_o 比值估算了微粒椭圆度的 b/a 比,即

(A)对于蛋形椭圆体(b/a<1)

$$f/f_o = \frac{[1-(b/a)^2]^{1/2}}{(b/a)^{2/3}\ln\left\{\frac{1+[1-(b/a)^2]^{1/2}}{b/a}\right\}} \qquad (7.7\text{-}35)$$

(B)对于扁球形椭圆体(b/a>1)

$$f/f_o = \frac{[(b/a)^2-1]^{1/2}}{(b/a)^{2/3}\tan^{-1}[(b/a)^2-1]^{1/2}} \qquad (7.7\text{-}36)$$

关于一些蛋白质的物理常数见表 7-6。人类血红蛋白形态,相当于 a/b=4.0 的非水化蛋形椭圆体或 a/b=0.24 的非水化扁球形椭圆体的 f/f_o 值列于表 7-7。并从图 7-21 中找出每克蛋白质的含水量。

表 7-6 20℃时一些蛋白质的物理(特性)常数

蛋白质名称(来源)	相对分子质量	扩散系数 D ($\times 10^7$)cm^2s^{-1}	沉降系数 S ($\times 10^{13}$)S	f/f_o 比值
细胞色素 c(牛心肌)	13370	11.4	1.17	1.19
肌红蛋白(马心肌)	16900	11.3	2.04	1.11
糜蛋白酶原(牛胰)	23240	9.5	2.54	1.19
β-乳球蛋白(羊乳)	37100	7.48	2.85	1.26
血清蛋白(人)	68500	6.1	4.6	1.29
血红蛋白(人)	64500	6.9	4.46	1.16
过氧化氢酶(马肝)	247500	4.1	11.3	1.25
纤维蛋白原(人)	339700	1.98	7.63	2.34
肌球蛋白(鳕鱼肌)	524800	1.10	6.43	3.63
烟草花叶病毒	40000000	0.46	198	2.03

表 7-7　20℃人类血红朊用沉降、扩散方法测得的某些特性

特性项目	数　　值	取得的方法
沉降系数 S	4.48×10^{-13}秒	实验
扩散系数 D	6.9×10^{-7}厘米^2/秒	实验
密度 ρ	1.34 克/厘米^3	实验
粒子质量 m	1.03×10^{-19}克/粒子	(7.7-33)式
摩尔质量 M	6.23×10^4 克/摩尔粒子	mL
f	5.86×10^{-8}克/秒	(7.7-31)式
微粒体积 V	7.69×10^{-20}厘米^3	$V_{非溶剂化}=m/\rho$
"相当球半径"R	2.64×10^{-7}厘米	$R=(3V/4\pi)^{1/3}$
f_o	4.98×10^{-8}克/秒	$f_o=6\pi\eta R$
f/f_o	1.18	—
$m_{1,b}/m_2$(球形)	0.48 克/克蛋白质	(7.7-34)式
蛋形非溶剂化 a/b	4.0	(7.7-35)式
扁球形非溶剂化 a/b	0.24	(7.7-36)式

例如人类血红朊(hemoglobin),在 20℃水中的离心沉降系数为 4.48×10^{-13}秒,扩散系数为 6.9×10^{-7}厘米^2·秒$^{-1}$,微粒密度为 1.34 克·厘米$^{-3}$,则微粒质量为

$$m=\frac{(1.38\times10^{-16})(293)(4.48\times10^{-13})}{(6.9\times10^{-7})\left(1-\frac{1.0}{1.34}\right)}=1.03\times10^{-19}\text{克/单个微粒}$$

粒微粒摩尔质量 $M=(1.03\times10^{-19})(6.023\times10^{23})=62300$ 克/摩尔微粒粘度和沉降-扩散间的共性,由图 7-20 和图 7-21(a)的比较中显得十分明显。图 7-21(b)中二条线交叠,轴比(a/b)约 2.5 和水化约 1.0 克水/克蛋白质。

7.7.4　有关用于检定和分离纯化蛋白质的物理化学性质

蛋白质的物理化学性质也是蛋白质进行分离纯化和分析检定的理论基础。

(一)蛋白质的一些用于检定的物理化学性质

早期发现,蛋白质中肽键基团与酪氨酸(Tyr)残基等在碱性条件下能与 Cu^{2+}生成紫红色络合物,此产物在 540nm 波长处有最大

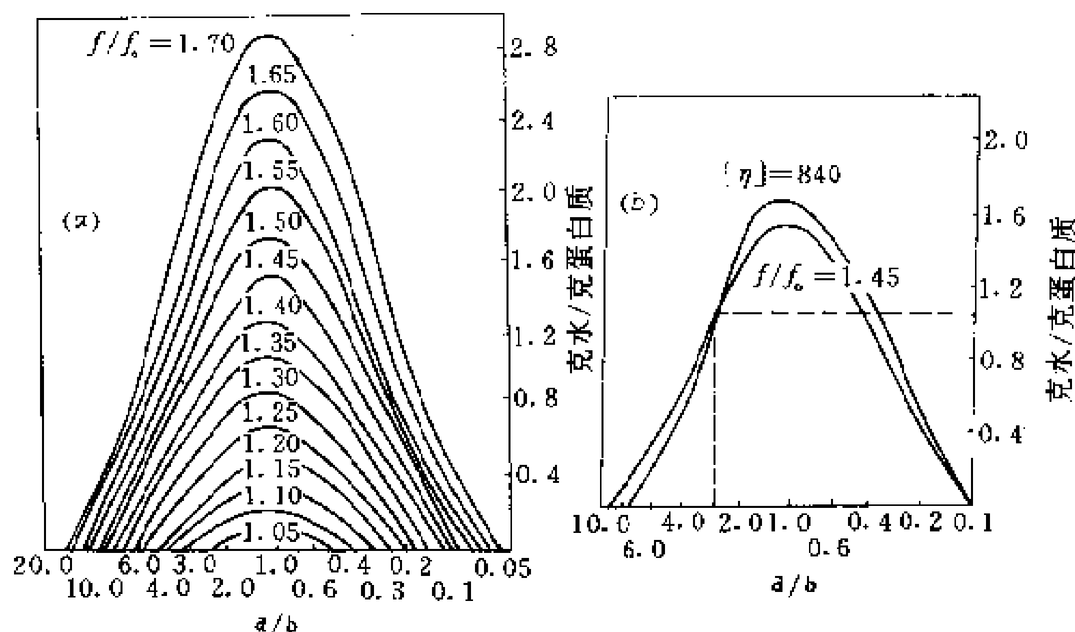


图 7-21

(a)蛋白质水溶液的 f/f_0 比值随不对称(a/b)和水化的改变而变化;(b)粘度法和沉降-扩散法所得结果基本重合,就水化和轴比关系而论,交点表征微粒的单值性。

吸收峰,借此可用于测定 0.5~10mg/ml 范围内的蛋白质浓度。该蛋白质与 Cu^{2+} 的络合物具有还原磷钼酸-磷钨酸的能力,反应所生成五价钼与钨的磷钼蓝与磷钨蓝物质,在 650nm 处呈现强的光吸收。利用此性质可用于在 0.01~0.5mg/ml 范围内测定蛋白质浓度。

人们还发现,蛋白质能在酸性条件下与考马斯亮蓝 G-250 结合而形成复合物,该复合物在 465~595nm 间有最大光吸收峰,而 595nm 波长处的吸收值是随蛋白质浓度升高而成比例地增大,可适用于 1μg~100μg/ml 范围内的蛋白质浓度的测定。

蛋白质还能与十二烷基硫酸钠(SDS)阴离子表面活性剂结合,结合后蛋白质分子内部、分子间以及与其它物质间的次级键遭受破坏而变性,即通常每克蛋白质能结合约 1.4g SDS,使蛋白质所带的负电荷远超过蛋白质原来的带电荷量,于是即可消除不同蛋白质间的荷电差异,而使电泳不受蛋白质带电荷量差别的影响。并且蛋白

质与 SDS 结合后都呈椭圆形而无大的形状差异的影响，这样蛋白质的电泳迁移率仅主要取决于它们的相对分子质量。利用某些蛋白质在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中的性态，便可以测得各种蛋白质的相对分子质量(参见图 7-22)。

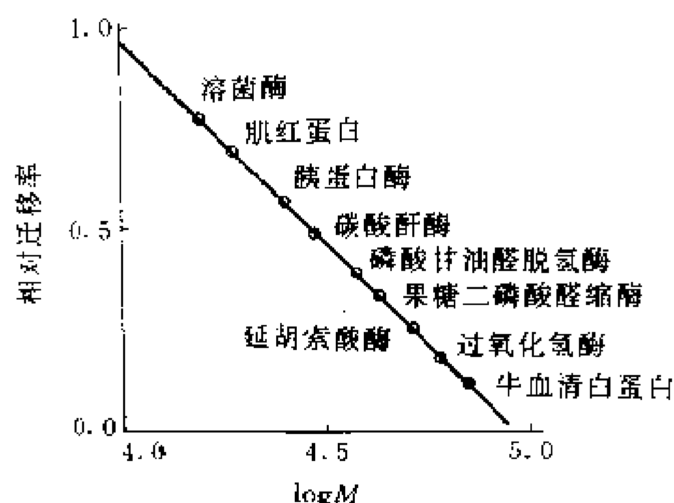


图 7-22 一些蛋白质在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中的性态

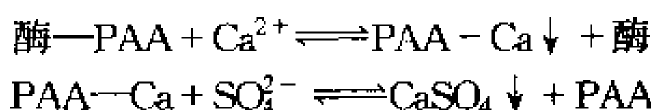
(二)蛋白质的一些用于分离纯化的物理化学性质

由于不同种类蛋白质肽链顺序排列中含有侧链氨基或羧基的各种氨基酸残基，具有结合质子或电离质子的性质差异，导致不同种类蛋白质分子在一定的 pH 溶液中带电不同，引起各种蛋白质胶体微粒带有不同的 ξ 电位和水合程度，所以不同蛋白质达到盐析所需要的离子强度不同。利用这一特性，通过控制盐浓度和盐种类(一般常用硫酸铵，也有用多价阳离子如 Zn^{2+}、Ba^{2+} 等盐类。)可将不同种类蛋白质粗略地彼此逐个沉析分离。也由于不同种类蛋白质所带电荷不同而引起水合强度不同，添加有机溶剂如丙酮或乙醇等以降低溶液的介电常数，并脱去水合的部分水分子，使水合程度不同的蛋白质粗略地沉淀而分离。

根据某些蛋白质性质，可利用离子型表面活性剂、非离子型聚合物(如聚乙二醇、聚乙烯亚胺等)与之形成复合物，使蛋白质沉淀析出，再设法将蛋白质分别溶解以达到分离的目的。聚丙烯酸(PAA)等多聚电解质能选择性地与某种蛋白质(如溶菌酶)结合而沉淀析出。



溶菌酶混合物 + PAA ⇌ 酶—PAA↓ + 杂质



$$酶—PAA + Ca^{2+} \rightleftharpoons PAA - Ca\downarrow + 酶$$

$$PAA—Ca + SO_4^{2-} \rightleftharpoons CaSO_4\downarrow + PAA$$

蛋白质的解离基团可与一些离子交换剂相互作用，因为各种蛋白质和离子交换剂在不同 pH 或离子环境等条件下有相应不同的解离状态，这就能发生选择性吸附作用。只要选择适当的离子交换剂，控制交换吸附和洗涤、洗脱条件，使各种蛋白质先后分别形成吸附或解吸状态，从而将它们分离开。在蛋白质纯化中主要采用的离子交换剂有〔$(C_2H_5)_2\overset{+}{H}NCH_2CH_2O$—纤维素（中强碱性阴离子交换剂）、$HOOCCH_2O$—Sephadex A25（弱酸性阳离子交换剂）等。

结　束　语

综上所述，生物机体内的蛋白质种类繁多，一级结构各异，空间构象都有自身的独特之处，则在功能上也呈现出各自的专一性，是构成生物最重要的生命要素之一。它们各谋其位，各尽所能，具有特异性识别能力。如果蛋白质变性，功能衰退，将导致生物在新陈代谢中失控，势必影响生物的健康。此外，病毒蛋白质的侵入，也会威胁生物的生命安全。因此，蛋白质的组成、结构与功能之间的关系，逐渐成为生物物理化学工作者的重要而有趣的研究课题之一。

第八章　核　　酸

核酸也是一类最基本的生命物质，它成为分子生物学研究的一大领域。生物体通过它实现遗传变异和决定发育生长的方向，因此，也成为现代生物工程高科技研究的前沿课题。本章将讨论核酸的化学组成、结构、性能和生理功能。

8.1　核酸的组成及其组成单位的结构和性质

核酸在自然界有二大类，它们分别是脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。其中的组分有嘧啶碱基和嘌呤碱基等两类碱基；结合的核糖类有 D-2-脱氧核糖和 D-核糖等两类；还有结合磷酸。可参见表 8-1。

表8-1　两类核酸的基本化学组成

DNA	RNA	组 合 产 物
腺嘌呤	腺嘌呤	
鸟嘌呤	鸟嘌呤	核苷
胞嘧啶	胞嘧啶	
胸腺嘧啶	尿嘧啶	
D-2-脱氧核糖	D-核糖	核苷酸→核酸 DNA 或 RNA
磷酸	磷酸	

8.1.1　DNA 和 RNA 的重要性与类型

DNA 的相对分子质量从 10^6 到 10^{11} 显得都很大，甚至还更大，一般其分子随生物的进化而增大。原核细胞没有细胞核，其行使遗

传信息功能的染色体含有一条高浓度压缩的 DNA 分子。各种病毒都是核蛋白，所含的核酸可能是 DNA，也可能是 RNA。但类病毒是不含蛋白质的自由 RNA 分子。真核细胞中含有不止一个染色体，每个染色体含有一个 DNA 分子，其细胞核的主要成分是由约 90% 的 DNA 和约等量的组蛋白结合构成的，比较稳定，在细胞分裂时期才稳定性下降。线粒体和叶绿体也含有 DNA。DNA（除了不含 DNA，只含 RNA 的病毒和类病毒外）是遗传信息的载体，任何生物体细胞都具有发育成完整生物的全套遗传信息。DNA 分子的一个成为遗传功能单位的片段称作基因。亲代的遗传信息就是通过 DNA 的自我复制而传到子代的。

RNA 在蛋白质生物合成过程中起着重要的作用，大量的实验表明，在生长和分泌的细胞中表达蛋白质生物合成基因功能和遗传信息的 RNA 含量特别丰富。人和动物的受精卵接受了亲代全套基因，由于基因的表达部分不同，在分化发育过程形成了各种组织器官，各种生物细胞中主要的 RNA 可分为三种：

（一）核糖体 RNA（rRNA）

细胞的核糖核酸约 80% 存在于核糖体内，而核糖体含有约 40% 的蛋白质和约 60% 的核糖核酸，它是由两个大小不同的亚基组成，具有高的相对分子质量，表现出驱动蛋白质生物合成的功能。

例如，大肠杆菌核糖体的沉降系数是 70S，它是由 30S 亚基和 50S 亚基构成的，两个亚基中所含 RNA 相对分子质量分别为 0.6×10^6（18S RNA）和 1.1×10^6（23S RNA）。

（二）转运 RNA（tRNA）

转运 RNA 也称“受体 RNA”，它的主要功能是在蛋白质生物合成过程中作为氨基酸受体，输送活化了的氨基酸转移到生长中肽链的正确位置上，起着携带和转移氨基酸的作用。tRNA 约为细胞 RNA 的 15%，拥有许多专门传递某种特定氨基酸的品种，所以常以所转移的氨基酸命名。如转移丙氨酸的 tRNA 被称作丙氨酸-tRNA（即 $tRNA^{Ala}$），它的沉降系数约为 4S，相对分子质量为 $2.3\times10^4\sim$

2.8×10^4，主要存在于细胞质的非颗粒部分。

(三)信使 RNA(mRNA)

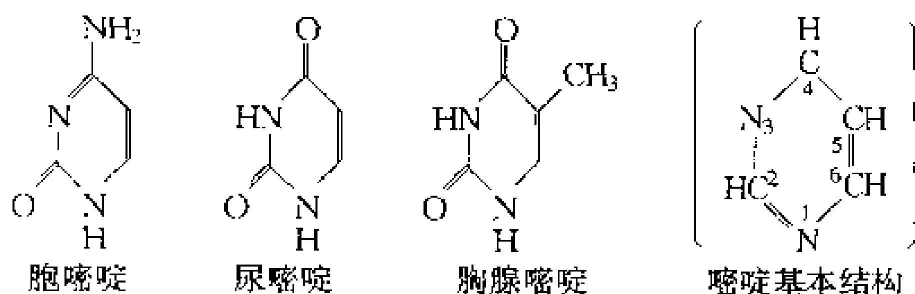
mRNA 能"转录"DNA 上的遗传信息并指导蛋白质的生物合成，即 mRNA 的生物功能是将 DNA 密码的信息转换为具有特定氨基酸排列顺序的蛋白质，起着信使的作用。每种蛋白质都需有一种相应的 mRNA，于是细胞中就应含有多种不同的 mRNA，它在细胞中约占细胞 RNA 的 5%。各种 mRNA 分子的大小相差很大，沉降系数大概有 8S～30S 和相对分子质量约有$(0.2\sim2.0)\times10^6$ 的差异。mRNA 在细胞质中常与核糖体结合一起。原核细胞的 mRNA 一般代谢活跃而很不稳定，寿命较短，如细菌的 mRNA 半衰期只有几分钟或几秒钟。真核细胞的 mRNA 一般寿命较长。

生物体是复杂的，除了上述几种主要的 RNA 外，在细胞核、线粒体和叶绿体中还存在少量其它种类的 RNA。

8.1.2 核酸基本组成单位的结构

(一)嘧啶碱

核酸中常见的三种嘧啶碱分别是胞嘧啶(Cyt)，尿嘧啶(Ura)和胸腺嘧啶(Thy)。

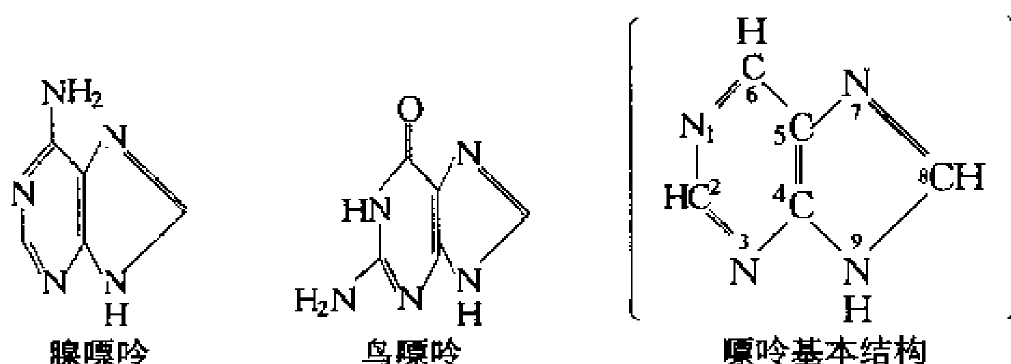


胞嘧啶　尿嘧啶　胸腺嘧啶　嘧啶基本结构

胞嘧啶于 DNA 和 RNA 中均存在。胸腺嘧啶一般只存在于 DNA 中，但在某些转运 RNA(tRNA)中也含有极少量的胸腺嘧啶。尿嘧啶仅存在 RNA 中。

(二)嘌呤碱

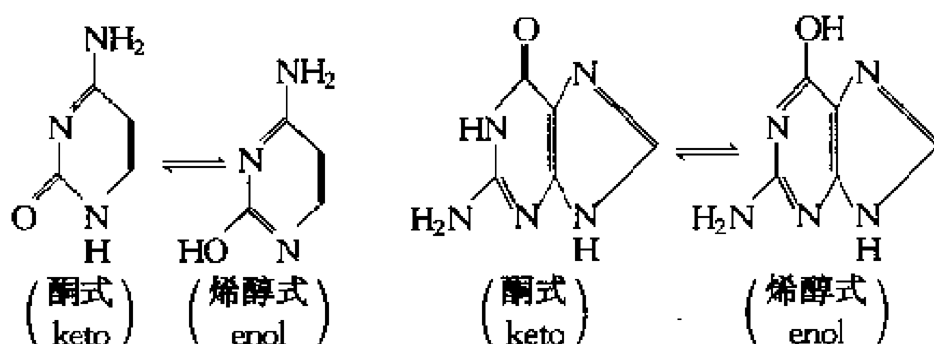
组成核酸的嘌呤碱有两种，它们分别是腺嘌呤(Ade)和鸟嘌呤(Gua)。



腺嘌呤　鸟嘌呤　嘌呤基本结构

(三)碱基在溶液中的两种异构体

嘧啶碱与嘌呤碱在溶液中可能以酮式和烯醇式两种互变异构体形式同时存在,例如:

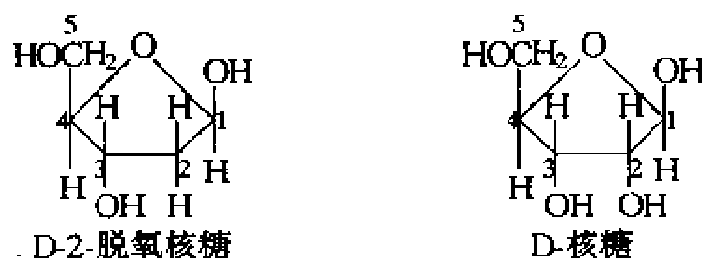


(酮式 keto)　(烯醇式 enol)　(酮式 keto)　(烯醇式 enol)

但在核酸结构中主要是酮式。

(四)戊糖

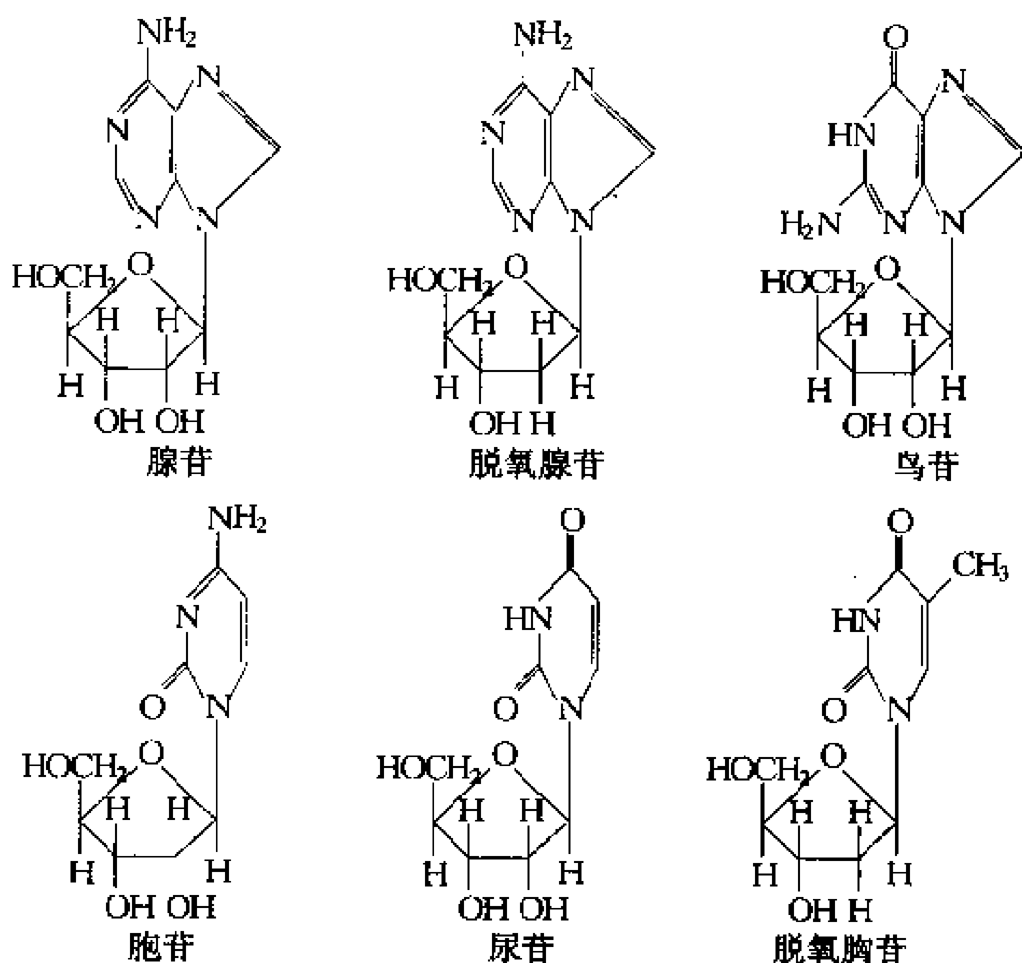
在核酸中戊糖都呈呋喃型环状结构形式。D-2-脱氧核糖参与DNA的组成,而D-核糖参与RNA的组成。两者的结构形式如下:



D-2-脱氧核糖　D-核糖

(五)核苷的组成与结构

核苷是碱基和戊糖以N—C键结合而成的糖苷。它们是腺苷、鸟苷、胞苷、尿苷、脱氧腺苷和脱氧胸苷等。经X-射线衍射分析发现,糖环平面(垂直于纸)和碱基平面(平行于纸面)互为直角,即

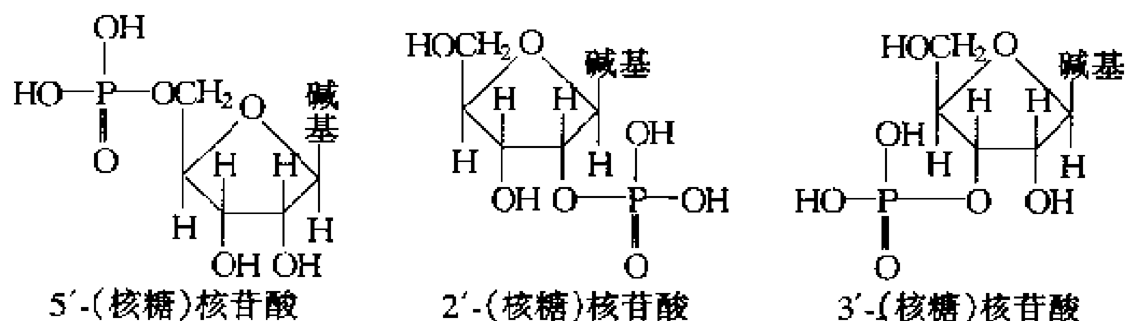


腺苷　　脱氧腺苷　　鸟苷

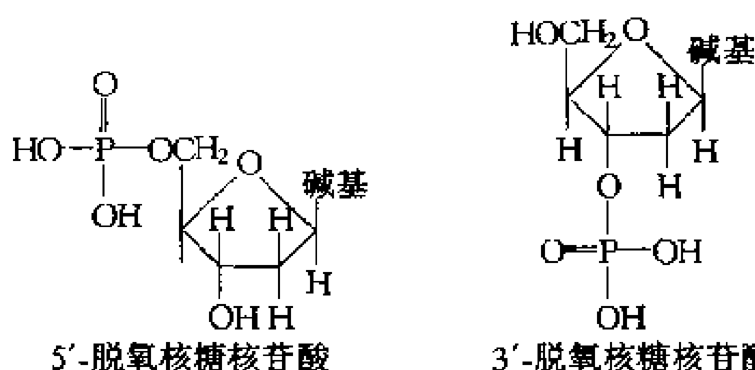
胞苷　　尿苷　　脱氧胸苷

（六）核苷酸的组成与结构

核苷酸是结合了碱基的戊糖羟基经磷酸化后形成核苷磷酸酯，也称为核糖核苷酸。按照戊糖上磷酸化位置，核苷酸中各核糖核苷酸可以有戊糖上 2′-，3′-和 5′-碳位磷酸化三种类型。各脱氧核糖核苷酸有 3′-和 5′-碳位上磷酸化的二种类型。



5′-（核糖）核苷酸　　2′-（核糖）核苷酸　　3′-（核糖）核苷酸



5′-脱氧核糖核苷酸　　　3′-脱氧核糖核苷酸

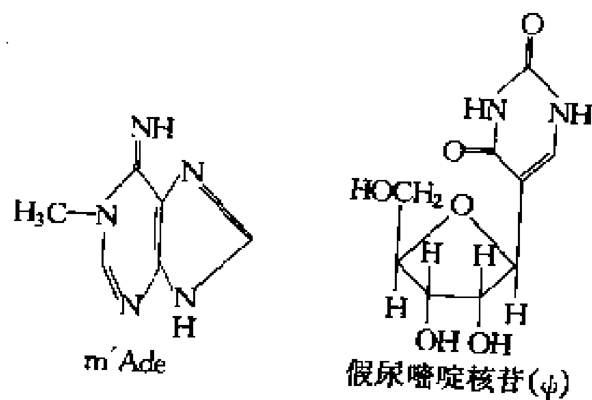
如果核糖核苷酸是腺苷中的戊糖磷酸化，那么产物可分别称 5′-腺苷酸(AMP)、2′-腺苷酸(2′-AMP)或 3′-腺苷酸(3′-AMP)，其余同理类推。

(七)其它碱基、核苷和核苷酸

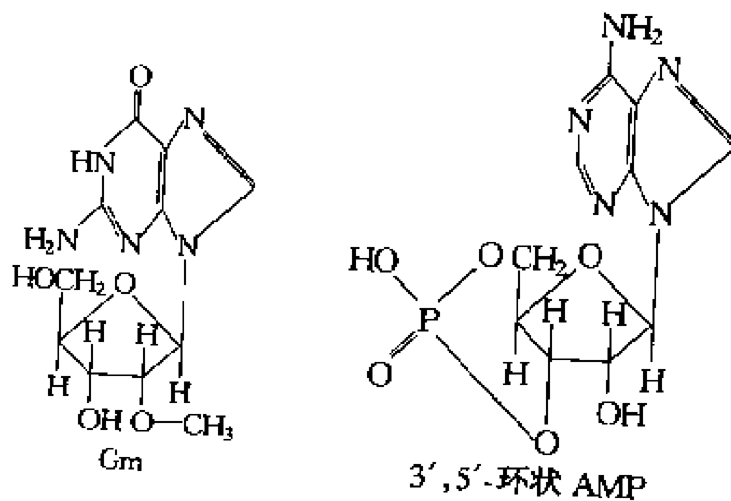
一些核酸中还发现少量经修饰的碱基，例如次黄嘌呤和黄嘌呤，甲基化嘌呤(如 m′Ade、m′Gua 等)和甲基化嘧啶(m^5Cyt)，还有 5-羟甲基胞嘧啶、二氢尿嘧啶、4-硫尿嘧啶等。

除了上述一些特殊碱基所组成的核苷外，某些转运 RNA(tR-NA)中还有少量的假尿嘧啶核苷(以 ψ 代表)和 2-O-甲基鸟嘌呤核苷(以 Gm 代表)等。

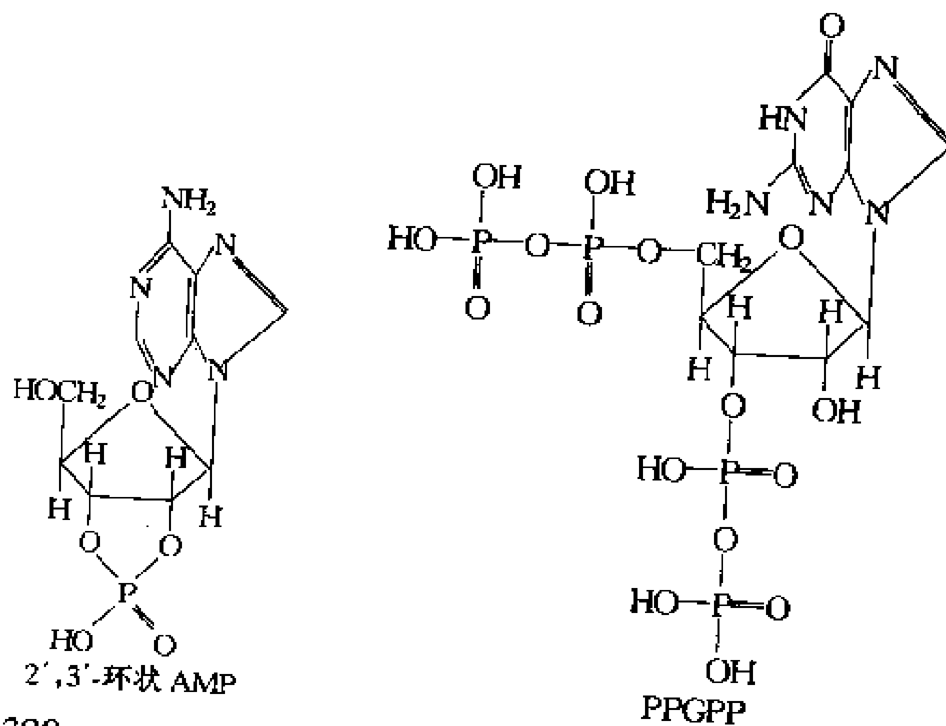
在生物体内，除了参与组成核酸的核苷酸外，还有一些具有特殊生理功能的游离核苷酸和核苷酸衍生物。例如有一类环化核苷酸，其中成员有 cAMP(3′,5′-环化腺苷酸)，cGMP(3′,5′-环化鸟苷酸)等，另一类是多磷酸核苷酸，有 ADP、ATP、CDP、CTP、UDP、UTP、TDP 及 TTP 等。它们分别是相应的碱基核苷二磷酸与碱基核苷三磷酸酯如腺(嘌呤核)苷二磷酸(ADP)与三磷酸(ATP)、胞(嘧啶核)苷二磷酸与三磷酸、尿(嘧啶核)苷二磷酸与三磷酸，胸(腺嘧啶核)苷二磷酸与三磷酸等。有一些特殊的多磷酸核苷酸如$_{pp}G_{pp}$和$_{ppp}G_{pp}$，它们被称为鸟嘌呤核苷四磷酸和五磷酸酯。它们的结构分别举例如下：



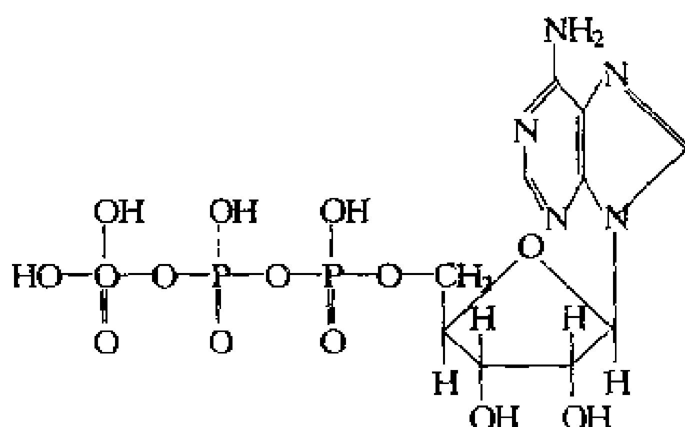
m′Ade　　假尿嘧啶核苷(ψ)



Gm　　3′,5′-环状 AMP



2′,3′-环状 AMP　　PPGPP



5′-腺苷三磷酸(ATP)
(若只连结二个磷酸,则为 ADP)

8.1.3 核酸中基本组成单位的性质

(一)碱基、核苷和核苷酸的物理性质

(1)水中溶解性能与稳定性

碱基和核苷在水中的溶解度一般不大,嘌呤衍生物比嘧啶衍生物更小些,溶解度顺序是胞嘧啶＞尿嘧啶＞腺嘌呤＞鸟嘌呤。核苷酸能溶解于水,它的钠盐易溶解于水。然而碱基、核苷和核苷酸三磷酸三者都不溶于乙醇等有机溶剂。

核苷酸、核苷和碱基等在水溶液中,尤其在中性和弱碱性溶液中一般较稳定。不过,嘌呤核苷和嘌呤核苷酸在酸性溶液中较易受破坏。5′-鸟嘌呤核苷酸和其 2′-位衍生物次黄嘌呤核苷酸(也称为肌苷酸)的水溶液具有很强的鲜味,而其它核苷酸溶液则只有酸味。以上这些纯化物质均可制成结晶。

(2)光学性质

由于碱基具有共轭双键,使碱基和它们的核苷、核苷衍生物在特定波长处显示出特征的光吸收性质,即在 260nm 处有各自的消光系数(见表 8-2)和在 220～330nm 范围内表现出各自的特征吸收光谱(见图 8-1)。利用这些特点可对它们进行定性分析和定量测定。

表 8-2　碱基、核苷、核苷酸的光吸收特性

分子名称	酸性 pH			近中性 pH			碱性 pH		
(相对分子质量)	pH	λ_{max}	$E\times10^{-3}$	pH	λ_{max}	$E\times10^{-3}$	pH	λ_{max}	$E\times10^{-3}$
腺嘌呤(135.13)	1	262.5	13.2	7	260.5	13.4	12	269	12.3
腺苷(267.24)	1	257	14.6	6	260	14.9	11	259	15.4
5′-AMP(347.22)	2	257	15.0	7	259	15.4	11	259	15.4
鸟嘌呤(151.13)	1	248	11.4	7	246	10.7	11	274	8.0
鸟苷(283.24)	0.7	256	12.3	6	253	13.6	—	—	—
5′-GMP(363.22)	1	256	12.2	7	252	13.7	11	258	11.6
胞嘧啶(111.10)	1	276	10.0	7	267	6.1	13	281.5	7.1
胞苷(243.22)	1	280	13.4	7	229.5	8.3	13	272.5	9.15
5′-CMP(323.21)	2	280	13.2	7	271	9.1	11	271	9.1
尿嘧啶(112.09)	4	259.5	8.2	7	259.5	8.2	12	284	6.2
尿苷(244.20)	1	262	10.1	7	262	10.1	12	262	7.45
5′-UMP(324.18)	2	262	10.2	7	262	10.0	11	261	7.8
次黄嘌呤(136.11)	0	248	10.8	6	249.5	10.7	11	259	11.1
黄嘌呤(152.11)	0	260	9.15	6	267	10.25	10	240	8.9
次黄嘌呤苷(肌苷,268.23)	0	251	10.9	6	248.5	12.3	11	253	13.1
胸腺嘧啶(126.11)	4	264.5	7.9	7	264.5	7.9	12	291	5.4
胸腺苷(dT,242.23)	1	267	9.65	7	267	9.65	13	292.7	7.4
5′-dTMP(322.21)	2	267	10.2	7	267	10.2	—	—	—

λ_{max}的单位为 nm。

图 8-1 一些碱基的特征吸收光谱

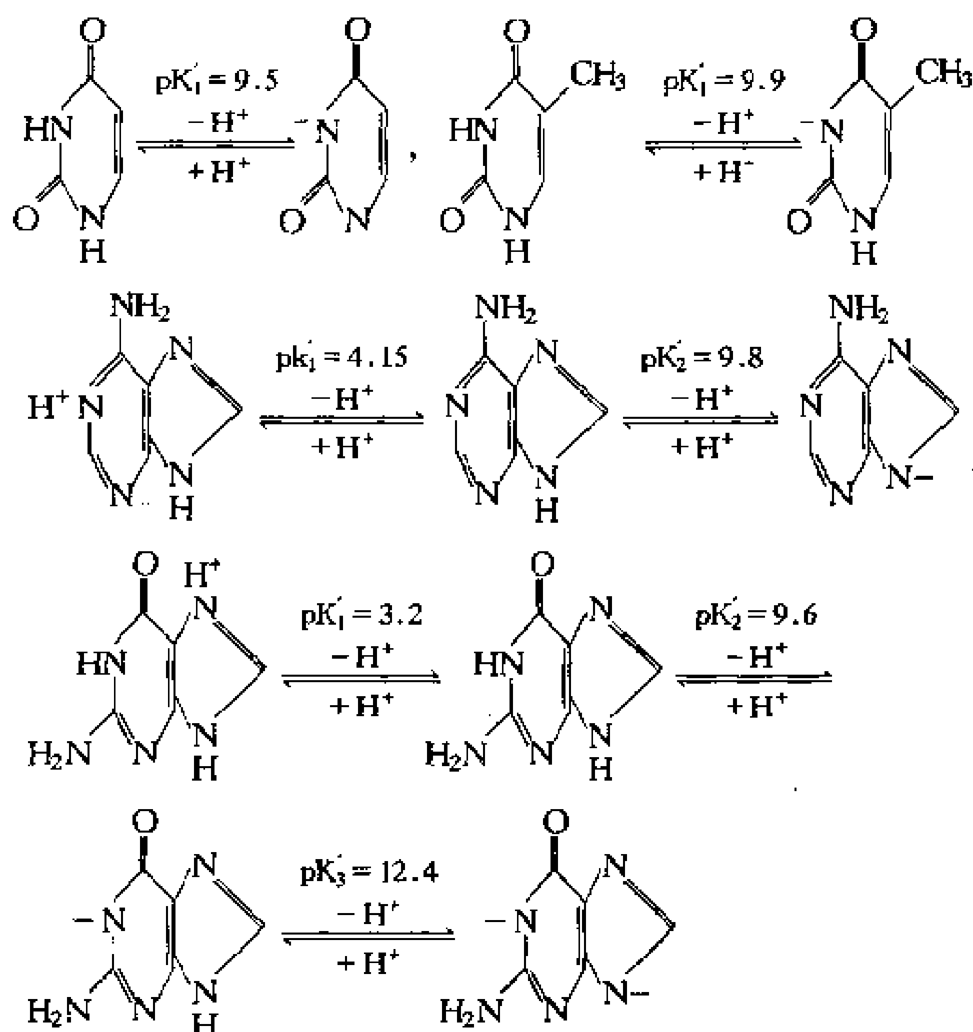
(a)中性溶液内 RNA 中四种碱基的光谱；

(b)脱氧胞嘧啶核苷在酸性、中性和碱性条件下的光谱。

(二)碱基、核苷和核苷酸的离解性质

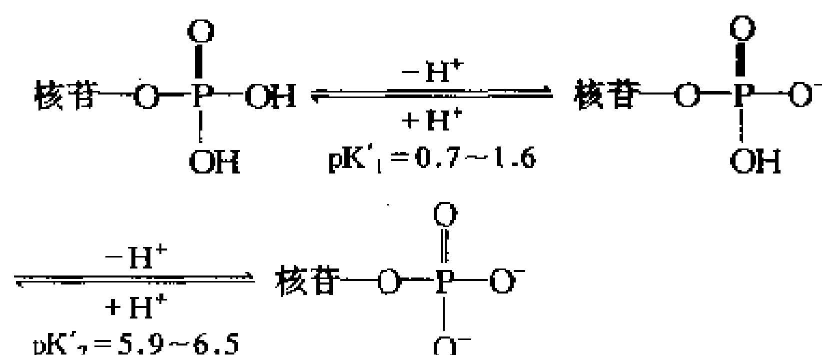
在溶液中嘧啶和嘌呤碱基的离解主要发生于杂环中的 N 上，不过嘧啶碱基的烯醇式羟基也能发生离解。离解常数的 pK′值见表 8-3 第一列数据。

$pK'_1=4.6$ ($-H^+$ / $+H^+$)　　$pK'_2=12.5$ ($-H^+$ / $+H^+$)



核苷的离解 pK′值与相应的碱基有所不同，这是由于戊糖的羟基也能离解(一般 pK′＞12)，且与碱基的离解相互影响有关，可见表 8-3 第二列数据。

核苷酸分子所结合的磷酸在溶液中也能发生离解，在多聚核苷酸中有一个离解基团，而单核苷酸中磷酸却有二个离解的基团，他们的离解反应如下：



由于核苷酸分子含有碱基和磷酸基的相互影响，所以在一定条件下可呈现两性离子的性质，它们所具有的等电点是由连接的磷酸第一离解基的 pK'_{01} 与碱基环含 N 的 pK'_{N1} 所决定〔$pI=(pK'_{01}+pK'_{N1}/2$〕。各类核苷酸的 pK′值见表 8-3 第三列数据。

表 8-3　一些碱基、核苷和核苷酸的 pK′值

碱基名称	碱基的 pK′值	核苷的 pK′值*2	5′-核苷酸的 pK′值
腺嘌呤	4.15;9.8	3.5;12.5	3.8;0.9;6.2
鸟嘌呤	3.2;9.6;12.4	1.6;9.2;12.4	2.4;9.4;0.70;6.1
胞嘧啶	4.6;12.5	4.15;12.5;12.3	4.5;0.80;6.3
尿嘧啶	9.5	9.2;12.5	9.5;1.0;6.4
胸腺嘧啶*1	9.9	9.8;>13	10.0;~1.6;6.5

*1 表中数据是胸腺嘧啶脱氧核苷及脱氧核苷酸的 pK′值；

*2 戊糖羟基的 pK′值。

图 8-2 是各种核苷酸随 pH 值变化的离解曲线，显然可利用于核苷酸分离。自然界存在的自由核苷酸称为 5′-磷酸酯，所以通常将 5′-核苷-磷酸简称为核苷磷酸。原来认为胸腺嘧啶是 DNA 的独特成分，故将脱氧胸苷简称胸苷-磷酸(或胸苷酸)，当发现在某些 RNA 中也含有少量胸腺嘧啶核苷酸后，就将 RNA 中存在的胸腺嘧啶核苷酸称为胸腺嘧啶核糖核苷酸。

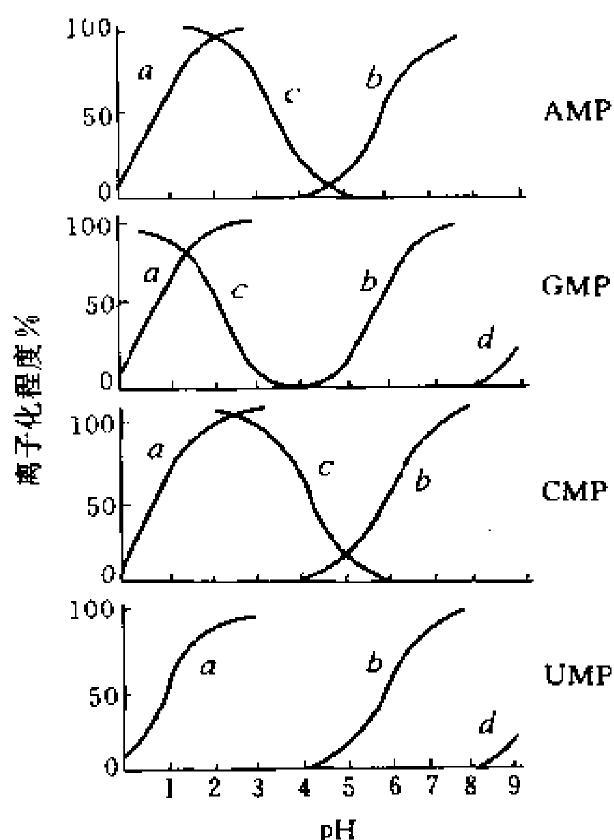


图 8-2　四种核苷酸的离解曲线比较

(a)第一磷酸基;(b)第二磷酸基;

(c)氨基;(d)烯醇式 OH 基。

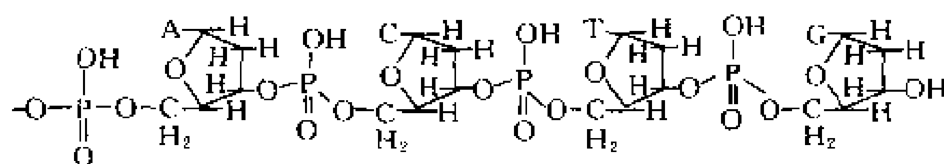
8.2　脱氧核糖核酸(DNA)的结构

核酸是以核苷酸作为基本单位多聚而成的生物大分子。很多实验表明,DNA 和 RNA 都是多聚核酸长链分子,它们具有一级结构(即核苷酸的组成和排列顺序)与高级空间结构(即多聚核苷酸链的链内和链间借氢键形成的折叠卷曲构象)。

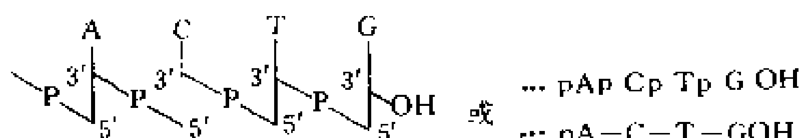
8.2.1　DNA 的一级结构

核酸的长链中每个核苷酸的 5′-磷酸和相邻核苷酸的戊糖上的 3′-羟基以 3′,5′-磷酸二酯键连接起来,而脱氧核糖和磷酸的连接构成 DNA 分子的主链,各种碱基形成分子的侧链。虽然核苷酸的种

类不多，但由于核苷酸的数目，各种类的比例和排列顺序的不同可构成多种结构的核酸。鉴于在核酸主链上戊糖和磷酸两种成分是不断重复的，就可用碱基的排列顺序来表示核酸的一级结构，可参见图8-3和图8-4。在简化表示法中p代表磷酸基团，当它在核苷符号



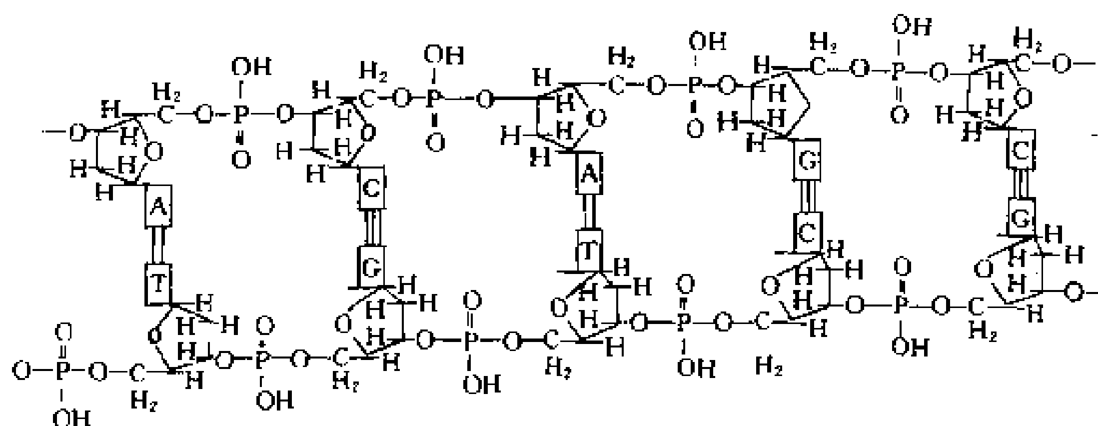
(a)单链DNA的一级结构



(b)线条式表示法　　　(c)文字表达法

图8-3　单链DNA的一级结构及其表示法

(b中垂直线代表糖的碳链)



(a) 双链DNA的一级结构

(b)文字表达法

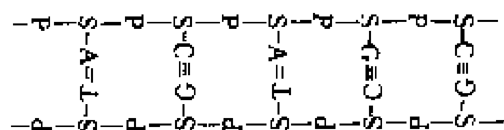


图8-4　双链DNA的一级结构及其表示法

(S为戊糖，P为磷酸)，T与A间二横代表可生成二个氢键；G与C间允许有三个氢键联结。例中T与A、C与G均成为碱基对。

左边时表示磷酸与糖的 $C_{5'}$ 上羟基结合，当它在该核苷符号右边时，则表示磷酸与糖环的 $C_{3'}$ 上羟基结合。于是成为从左到右排列顺序的方向(碱基顺序一般也按 5'→3'方向书写和阅读)。绝大多数的 DNA 分子是由两条碱基互补的单链构成的双链分子(参见图 8-4)。不过，也有少数 DNA 是单链分子(如噬菌体 $\phi\times174$)。

DNA 分子可按线状(单链、双链)或环状的形式存在，对于每个线状形式的分子都有一个未与其它核苷酸相连的 5'-端(始端羟基)和 3'-端(末端羟基)。DNA 是有极性的，它的相对分子质量非常大，最小的天然双链 DNA 也含数以千计的碱基对(相对分子质量在 10^6 以上)，人的 DNA 分子所含的碱基对(bp)约可达 10^8 以上。

不同生物的 DNA 各有其特定的碱基组成，也有其特定的核苷酸排列顺序(一级结构)，这决定着生物的遗传特性，即生物的遗传信息都贮存于 DNA 的结构中，也就是 DNA 按相应的核苷酸排列顺序将一些信息编码在自己的结构之中。因此，对核酸的研究具有十分重要的意义，也是开拓生物工程的重要领域。

经研究发现，在 DNA 分子中往往可以划分出不同的区域，不同区域有着不同的生物功能，有的区域编码特定的蛋白质或 RNA，有的区域则起着复制、转录和翻译调控信号作用，这些区域在 DNA 分子中的特定分布构成了 DNA 分子的“躯体”，这种装配被称为 DNA 顺序组织。所以，可以认为 DNA 顺序组织是建立在 DNA 的一级结构基础上，它将结构和功能融合一起。

DNA 在原核生物和真核生物中的一级结构与顺序组织是有些不同的。在原核生物中 DNA 的大部分成分是功能上决定蛋白质结构的结构基因，并往往组织在一起，以后能转录于同一信使 RNA (mRNA)，而且还可看出基因重叠现象，即功能上相关编码不同蛋白质的基因往往交错重叠于 DNA 某一区域，例如：

K基因的起始密码

B 基因的终止密码 → TGATG

A基因的Asp密码

K基因的 Asn · Glu密码 →

AAATGAGG ←C 基因的Met · Arg密码

A 基因中的 Lys 和终止密码 →

使同一核苷酸顺序在重叠基因中包含着多种生物信息。原核生物的 DNA 中很少观察到重复出现所谓重复序列的核苷酸序列，虽然也有正读和反读核苷酸序列都相同的回文结构，但比真核生物 DNA 要少且长度较短，大多数出现于限制性内切核酶作用位点。

在真核生物的 DNA 中决定蛋白质结构的结构基因只占小部分，与蛋白质有关的结构基因组织在一起的情况很稀有，而且似乎没有基因重叠现象，却在编码 RNA 和蛋白质的基因中可能有插入顺序。还可能转录出两端的非编码区（参见图 8-5）。在真核生物的 DNA 中已发现有许多重复出现的核苷酸序列（即有许多重复序列），有的重复出现的次数甚至高达百万次，成为高度重复顺序。在各种 DNA 中，重复序列的长度可各不相同，其含量也大不相同。

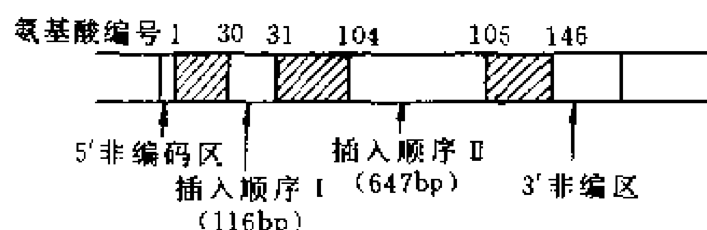


图 8-5 小鼠 β 珠蛋白基因的插入顺序

β 珠蛋白由 146 氨基酸组成，被三个隔开的外显子所编码，基因中除插入顺序外，还转录出两端的非编码区。

真核生物 DNA 结构的另一特点是具有大量回文结构〔Paiindromic structure，回文的意思是一级结构的正读顺序与反读顺序都相同的回旋（180°）对称性〕。回文结构往往出现在 DNA 和蛋白质的顺序排列中（参见图 8-6），特别在起调控作用的蛋白质相互作用的部位。

8.2.2 DNA的二级结构

在1953年，Watson和Crick对有关DNA二级结构的研究中总结了大量实验信息，例如，Wilkins和Franklin对不同来源的DNA纤维进行X-射线衍射结构分析，结果表明DNA含有两条或两条以上多核苷酸链的螺旋结构；Chargaff等对多种生物DNA的碱基组成应用层析分析法，得知DNA中的腺嘌呤(A)数目与胸腺嘧啶(T)的数目相等。胞嘧啶(C)的数目(或有5-甲基胞嘧啶参与)和鸟嘌呤(G)的数目相等(见表8-4)；电位滴定法实验发现，嘌呤和嘧啶的氨基和—NH—OC—基团没有滴定曲线，而DNA的磷酸基团有滴定曲线，并进一步推定腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶(T)间是以两个氢键连接起来的，而鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)间允许三个氢键相连系等。于是提出了DNA双螺旋结构模型(见图8-7)。

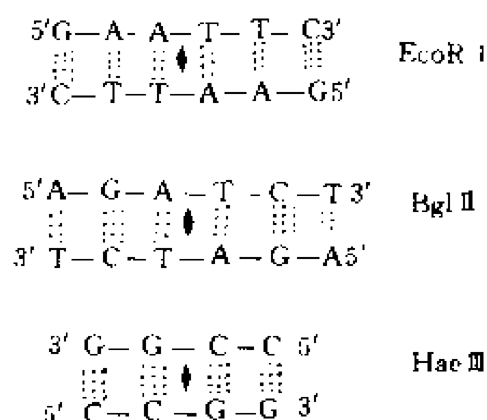


图8-6 三种限制性内切核酸酶专一的顺序中回文结构示意（◆表示旋转对称轴）

表8-4 不同来源的DNA中碱基组成(摩尔%)

DNA的来源	腺嘌呤A	胸腺嘧啶T	鸟嘌呤G	胞嘧啶C	5-甲基胞嘧啶
牛胸腺	28.2	27.8	21.5	21.2	1.3
牛脾	27.9	27.3	22.7	20.6	1.3
牛精子	28.7	27.2	22.2	20.7	1.3
大白鼠骨髓	28.6	28.4	21.4	20.4	1.1
鲱鱼睾丸	27.9	28.2	19.5	21.5	2.8
小麦胚	27.3	27.1	22.7	16.8	6.0
酵母	31.3	32.9	18.7	17.1	—
大肠杆菌	26.0	23.9	24.9	25.2	—
结核分支杆菌	15.1	14.6	34.9	35.4	—
φ×174(单链)	24.3	32.3	24.5	18.2	—

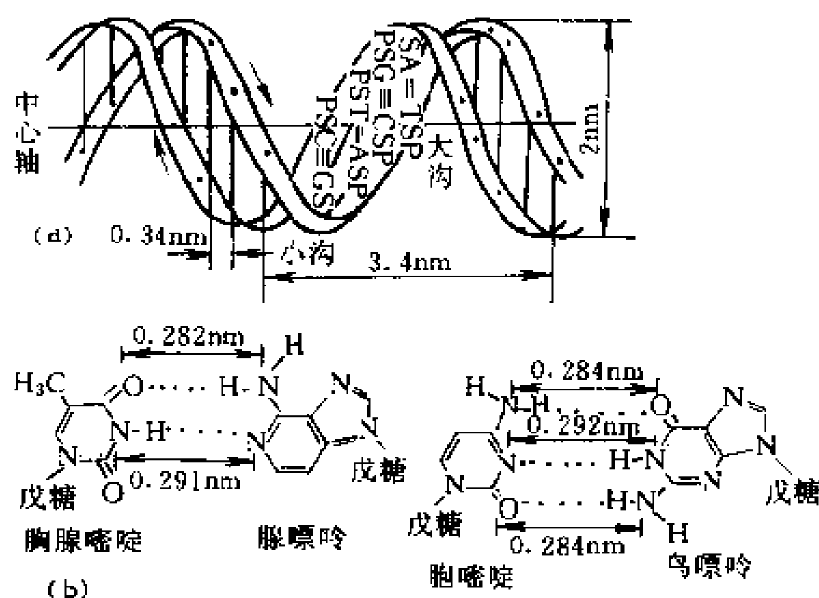


图 8-7

(*a*)DNA 双螺旋(右旋)结构带条表示法,

P 代表磷酸二酯键,S 代表脱氧核糖。

(*b*)结构中 G-C 间和 T-A 间的氢链连系。

DNA 双螺旋结构模型认为:DNA 是由两条方向相反(一条 5′→3′,另一条 3′←5′)而平行的多聚核苷酸链,围绕共同的中心轴构成的双螺旋结构。通常 DNA 的两条链中碱基按照 A 与 T 和 G 与 C 配对互补的规律,通过氢键连接一起,使脱氧核糖和磷酸二酯键构成的主链形成右旋骨架,并将碱基对层叠于螺旋内侧,其碱基平面约与螺旋中心轴垂直,又可借碱基芳香环的 π 电子产生疏水堆集力,加强了 DNA 双螺旋结构的稳定性。核糖-磷酸构成的主链在外侧,糖环的平面约与中心轴平行,而螺旋表面呈现出大沟和小沟。双螺旋的直径为 2nm,2 个相邻碱基对平面间的距离是 0.34nm,每 10 个碱基对构成一段完整的转一周螺旋,其长度为 3.4nm(螺旋)。主链中相邻核苷酸彼此的夹角是 36°。

大多数自然界的 DNA 二级结构是双链螺旋结构,而某些小细菌病毒如 ϕ×174 和 M_{13}是单链分子。由于 DNA 的碱基顺序不同,所处的相对湿度情况、盐的种类与浓度等不同,可能会产生不同的双

螺旋构象。例如DNA钠盐纤维在相对湿度90%时所处的状态是一种B型构象，它与Watson和Crick所提出的DNA双螺旋模型非常相似，很接近低离子强度溶液和细胞中的DNA构象。如果是钠盐、钾盐或铯盐的DNA在相对湿度75%时，就可能变为不同于B型的A型构象，其碱基平面不垂直于中心轴而是倾斜了20°，相邻碱基夹角为32.7°，螺距变成2.8nm，每转一周的碱基对数目也相应随之变化。当钾盐的DNA在相对湿度降到66%时，DNA就变成C型，碱基平面的倾斜角为6°，相邻碱基夹角为38°，螺距为3.1nm。除此之外，还可能有其它的多种构象。由此表明，双螺旋外侧带负电荷的磷酸基团同带正电荷的阳离子（如Na^+、K^+、Mg^{2+}和Mn^{2+}等的结合）间形成的离子键和水合作用对DNA双螺旋结构也有一定的稳定作用，甚至有影响构象的效应。

虽然如今发现自然界存在的DNA二级结构几乎全是右旋DNA，但人工合成的小片段晶体d($C_pG_pC_pG_pC_pG$)在分辨率为0.09nm的X射线衍射分析中得知是左旋的双螺旋结构。它的以碱基对连系的反向平行的糖-磷酸双主链是呈Z字形左向盘绕，这种二级结构构象被称作Z-DNA。Z-DNA的螺旋直径为1.8nm，螺距为4.5nm，螺旋每转一周含12碱基对，碱基对偏离中心而近螺旋外侧，螺旋表面只呈现小沟。由此推测左旋螺旋也可能存在于自然界DNA中。

由上述得知，DNA存在着不同构象的变化，说明双螺旋结构具有一定柔顺性，在不同条件下转变为不同构象可能有不同的生物功能。

8.2.3 DNA的三级结构

双螺旋结构的DNA在三维空间进一步扭曲就会形成DNA的三级结构，有的可呈线性分子形式存在，有的也可能以共价双链环状结构出现。某些噬菌体DNA，某些细菌或小病毒的DNA，线粒体与叶绿体中DNA等，它们的相对分子质量不太大（约在$10^6 \sim 10^7$），较易构成双链环状形式，环状结构又含两种类型：松弛型环状结构与超

螺旋型结构(参见图8-8)。当某些线状DNA与其它分子(特别是与蛋白质分子)结合时,也可能构成超螺旋构象,可见超螺旋结构具有普遍生理意义。

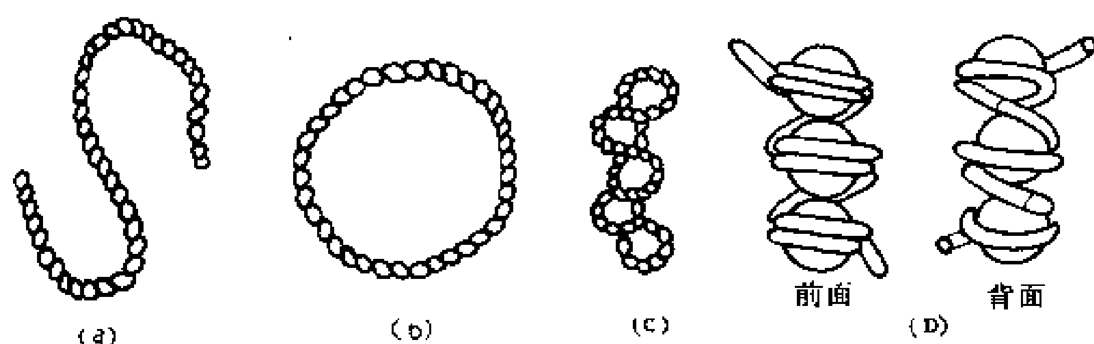


图8-8　DNA三级结构模式

(a)线型双螺旋结构;(b)环状松弛型结构;(c)环状超螺旋型结构;(d)缠绕在组蛋白(圆球表示)上的超螺旋DNA(带状表示),结合成核粒的三级结构。

超螺旋结构又可分为右旋超螺旋,常称负超螺旋和左旋超螺旋又称正超螺旋。负超螺旋是环状双链DNA普遍存在的超螺旋形式,由于它是每10个核苷酸旋转一周的正常B型DNA双螺旋多转了几圈而产生了相应的张力,使分子内部原子偏离正常位置,重新排列导致分子进一步扭曲。这扭曲张力的作用有解开双螺旋的倾向。正超螺旋提供的一种扭曲张力是有拧紧双螺旋的倾向。它们与正常的没有张力的环状双链(称松弛态)关系如图8-9。

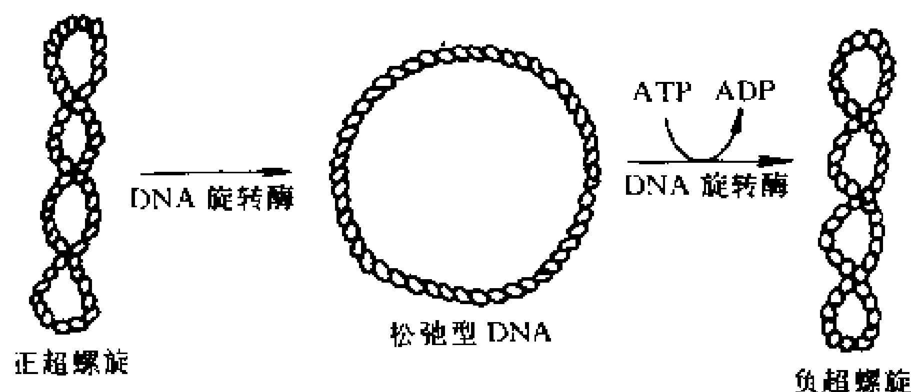


图8-9　正负超螺旋DNA与松弛型DNA间转变关系

真核细胞染色质DNA的结构极为复杂，双螺旋DNA盘绕在组蛋白上形成超螺旋而组合为核粒，许多核粒经DNA链连在一起构成念珠状串链结构，念珠状串链进一步盘绕构成更复杂更高层次的结构。

8.3 RNA的结构

8.3.1 RNA结构与DNA的相似和差异

RNA是核苷酸以3′,5′-磷酸二酯键连接起来的链状分子，这一点与DNA相似。RNA一般比DNA小得多，最小的有80个左右核苷酸，相对分子质量约25000，最大的不过3000个左右核苷酸，相对分子质量约有10^6。根据X-射线分析和RNA的某些物理化学性质证明，大多数天然RNA分子是单链的，RNA也是由四种基本碱基排列顺序组成的，不过分子中没有胸腺嘧啶，却有尿嘧啶（参见图8-10），也包含一些稀有碱基如假尿嘧啶，甲基化碱基等。

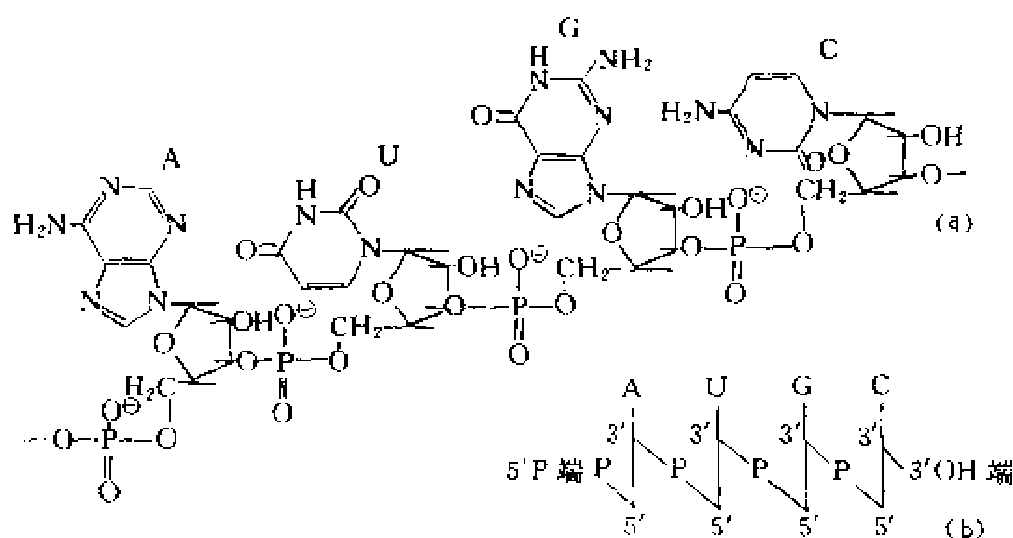


图8-10 RNA分子的组成和一级结构

(a)组成和顺序排列片段；(b)线条式表示法。

除了少数如伤瘤病毒等具有双链结构之外，在RNA中A与U、G与C之间一般不像DNA那样有严格的碱基组成比规律。由于

RNA 链的自身回折，在许多局部区域造成可配对互补的碱基相遇而产生碱基对，让 A 与 U、G 与 C 之间由氢键连接而构成局部双螺旋结构。不能配对的碱基区则形成环状突出区域。不同的 RNA 它的双螺旋区占的比例各不相同，并和 DNA 双螺旋有一些差别，RNA 内约有 40% ～ 70% 的核苷酸参与螺旋的形成，所以多核苷酸链的 RNA 是含有许多短而不完全的螺旋区。图 8-11 以顺序排列方式表示了这类结构。

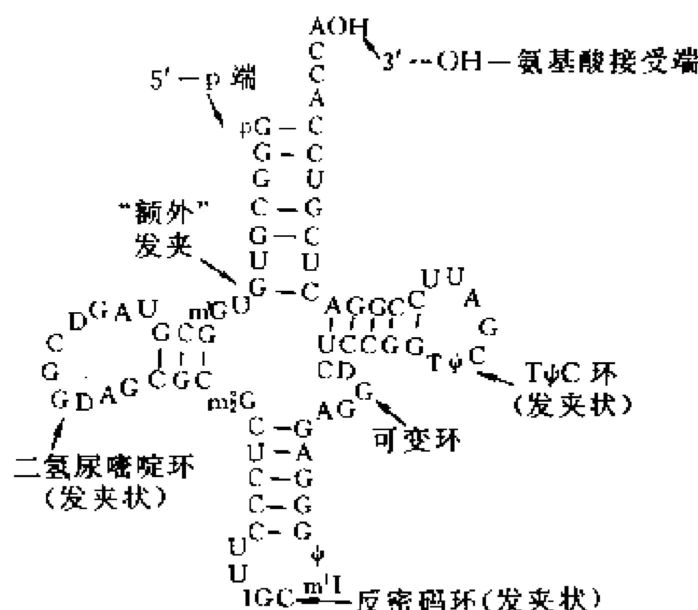


图 8-11　Penswick 等修正的三叶草叶式酵母丙氨酸-tRNA 的核苷酸顺序及二级结构

A = 腺苷，G = 鸟苷，C = 胞苷，U = 尿苷，T = 胸腺嘧啶核苷，I = 次黄苷，ψ = 假尿苷，D = 5，6-二氢尿苷，m^1I = 1-甲基次黄苷，m^1G = 1-甲基鸟苷，m_2^2G = N^2，N^2-二甲基鸟苷。

RNA 的结构按主要的三类（转运 RNA、信使 RNA、核糖体 RNA）分别进行讨论。

8.3.2　转运 RNA(tRNA)的结构

tRNA 的作用主要是在机体内为其合成蛋白质并转运氨基酸方面。然而，每种氨基酸都有一种或几种相应的 tRNA，一般 tRNA 含

有70～90个核苷酸，相对分子质量为25000左右，沉降常数约4S。

Holley等首先在研究丙氨酸-tRNA一级结构基础上提出tRNA的三叶草叶型二级结构模型（见图8-11），后来发现tRNA几乎都类似三叶草叶型，一般由四臂四环组成，能构成碱基对的区域形成臂，不能形成碱基对的区域则构成突环，3′-端都是C_pC_pAOH，而5′-端多数为$_pG$，少数是$_pC$。整个三叶草叶型结构可分五个部分。

氨基酸接受转运臂是由5个以氢键连接的碱基对和2对无氢键连系的碱基组成，富有G-C碱基对。它带有C_pC_pAOH3′端接受氨基酸的部位，在转运氨基酸时，活化了的氨基酸就连接在此突出的3′-端CCA的A上被转运。

在左侧一臂所连接的突环含有两个二氢尿嘧啶（D）分子，称作二氢尿嘧啶环（DHU环或简称D环）。该环通过3～4个碱基对所形成的短臂和tRNA主体连接。

右侧有一个含有TψC顺序的TψC环（ψ代表假尿苷）；它是由7个核苷酸组成的，除了个别之外，所有tRNA都含TψC碱基序列，这序列（GTψCG）有识别核糖体并参与rRNA中一些保守序列相互作用的功能。TψC环是通过5个碱基对作为臂和tRNA主体相连的。

下方有含7个核苷酸的反嘧码子环，环中三个碱基（IGC）是与三联密码相对应的反密码。反密码子的第三个（5′端）碱基称为变偶碱基，当密码子与反密码子配位时，与变偶碱基结合的密码子3′端碱基可有某种程度的变动。该反密码子环是通过与5个碱基对所构成的臂和主体连接。

在反密码子环与TψC环按顺序相互连接的中间夹有一突环称为可变环。不同的tRNA中可变环上核苷酸的数目变化较大，变动的范围约在3～18个的碱基，据此可用于鉴别不同的tRNA。

tRNA的三级结构是在顺序排列和二级结构的基础上进一步折叠所形成的倒L形构象（图8-12），其中氨基酸接受臂和TψC组成一个双螺旋，构成L字形的下部横划。D环和反密码子环形成另一双螺旋，构成L字形的竖划。L字形的上端是反密码子，其横划一端为

CCA3′-OH端。L形折叠构象可能是所有的真核tRNA和原核tRNA都呈现的三级结构。不过，各种tRNA之间是有些差别的，例如两个螺旋间拐角的大小，CCA端伸延的程度等。此外，tRNA分子中都含有多少不等的修饰碱基，在各tRNA中某些位置上含核苷酸种类变化很少，甚至往往是不变的核苷酸。

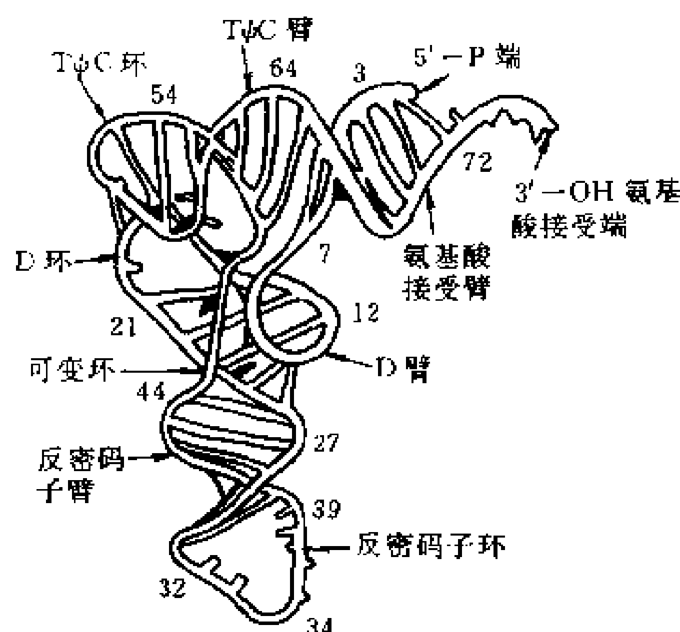


图8-12 酵母苯丙氨酸tRNA的三级结构
不同的tRNA，其核苷酸组分
和顺序排列可有所不同。

8.3.3 信使RNA(mRNA)

真核生物和原核生物的mRNA在结构上是不同的，在原核生物中mRNA多数是多顺反子，即编码的转录产物往往包括多种蛋白质，而真核生物的mRNA一般是单顺反子，病毒的RNA也是单顺反子，mRNA分子的大小可以相差很大。

真核细胞的mRNA是在细胞核中转录合成的，然后在细胞质中翻译为蛋白质，于是mRNA 5′-末端都有一个特殊的$m^7G^5ppp^5Nm^2$(Nm^2)“帽子”，其中m^7G_{ppp}为7号位N上被甲基化了的5′-鸟苷三磷酸，Nm^2(Nm^2)代表核糖2号碳位羟基上氢由甲基取代了的两个相

邻核苷酸，它们三者通过两个 5′-磷酸酯键相连接一起(图 8-13)。5′-末端帽子结构与蛋白质的翻译起始有关。绝大多数 mRNA 在 3′-末端有一段长约 200 个残基的多腺苷酸(polyA)“尾巴”，polyA 的作用可能和 mRNA 从细胞核转移至细胞质有关，还可能和 mRNA 的半寿期有关。

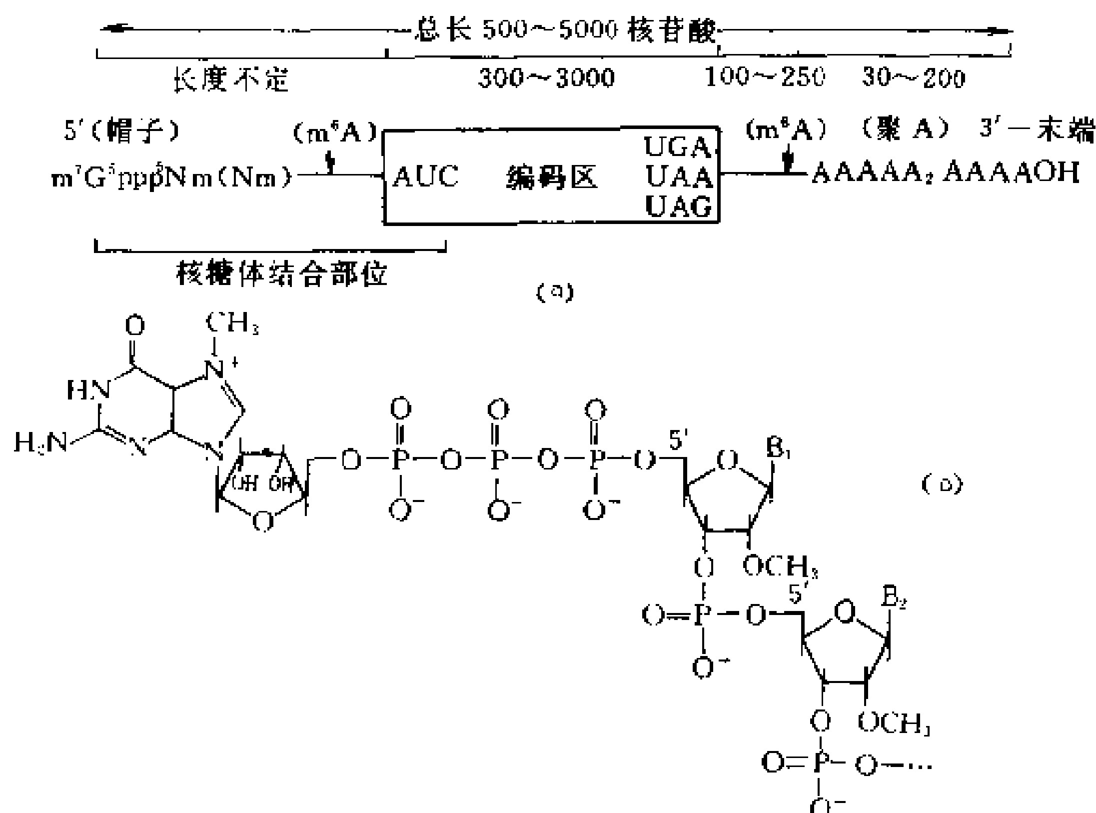


图 8-13

(*a*)真核生物 mRNA 的结构示意；

(*b*)真核生物 mRNA5′端帽子结构通式(B_1、B_2 为碱基)。

原核生物细胞的 mRNA 一般没有这种帽子结构，也无 polyA 结构。

生物界有多种多样的 mRNA，它们的分子长链存在各种复杂的回折所产生的双螺旋与突环结构，例如图 8-14 的噬菌体 MS_2 的 RNA 分子中外壳蛋白基因的二级结构已是相当复杂了。

图 8-14　噬菌体 NS_2RNA 分子中外壳蛋白基因的二级结构

8.3.4 rRNA

rRNA 是构成核糖体的主要成分。原核生物的 rRNA,例如大肠杆菌有三类 5S rRNA(相对分子质量约 36000,核苷酸数目 120)、16S rRNA(相对分子质量约 5.5×10^5,核苷酸数目 1700)和 23S rRNA(相对分子质量 1.2×10^6,核苷酸数目 3700)。真核生物的 rRNA 较复杂,有 5S、5.8S、16S、18S、25S 和 28S 等 rRNA。

原核生物和真核生物都含有的 5S rRNA,由图 8-15 示出它的二级与三级结构,它有五个双螺旋区(A~E),一个多分支环(M),二个中间环(I_1,I_2)和二个突环(H_1,H_2)。在单链部分有一些保守的序列,例如参与和 tRNA 的 GTψCG 相互作用的 CGAAC 序列,以及参与和 50S 核糖体亚基中的蛋白质相互作用的 GCGCC$^{G}_{A}$AUGGUAGU 序列。5S rRNA 在二级结构基础上进一步折叠所形成的三级结构绘于图 8-15(b)。

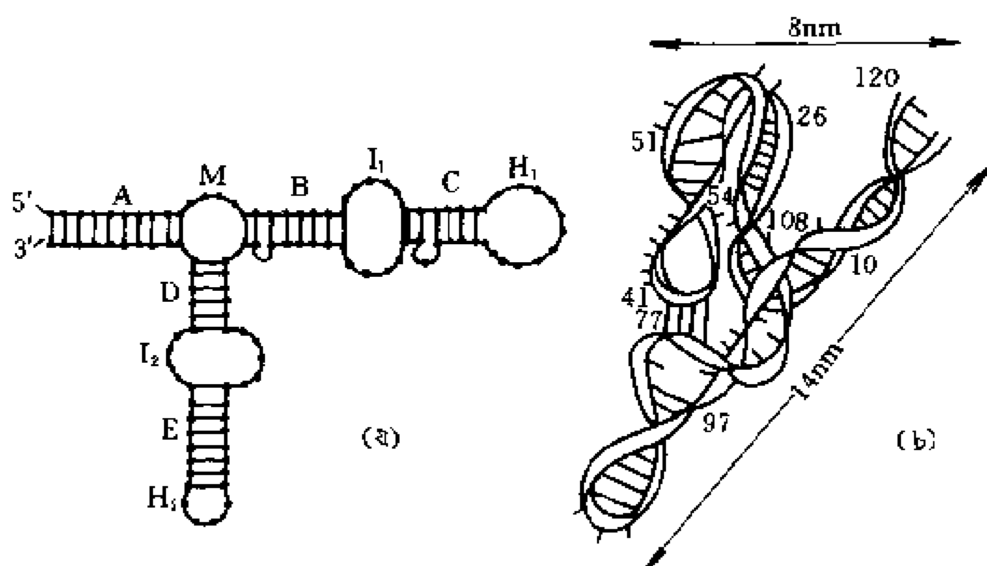


图 8-15　5S rRNA 的二级结构(a)与三级结构(b)

A-E 为双链区,M 为多分枝环,I_1 和 I_2 为中间环,H_1 和 H_2 为突环。

真核生物所含的 5.8S rRNA 是在 28S RNA 变性条件下分出而得到的,它由 160 个左右的核苷酸组成(图 8-16),其一级结构中有 CGAAC 保守系列,由此推测,它可能起着类似于 5S rRNA 的功能。

但它的二级结构至今尚未得到满意的结论。

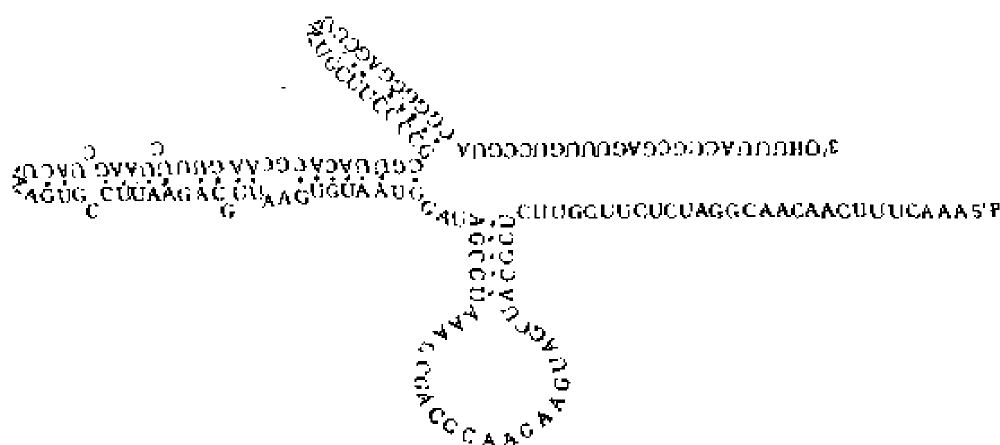


图8-16 酵母的5.8S rRNA的二级结构

存在于原核生物或叶绿体等细胞器中的16S rRNA，是由约1500个以上核苷酸组成，其中有少量的修饰核苷酸。它们具有很强的进化上保守性，致使各种来源的16S rRNA却有相似的二级结构，而且在非螺旋区的某些序列一级结构也保守不变。16S rRNA有十分复杂的结构和生物功能，它的3'-末端存在的一个ACCUCCU序列能和mRNA翻译起始区互补，还在有些茎臂上出现突起的单碱基，这可能与识别核糖体蛋白有关。

18S rRNA是由1800个左右核苷酸组成的，其中位于结构的高度保守区含一些甲基化的修饰成分。它具有很强的进化保守性与16S rRNA相似，其高级结构是非常复杂的。

23S rRNA和16S rRNA一样，存在于原核生物或叶绿体等细胞中，是由约3000个以上核苷酸组成。分子中存在着与tRNA、5S rRNA、5.8S rRNA等相互作用的位点。它在结构上也具有进化保守性，其二级结构也很复杂。

26S rRNA由约3400个核苷酸组成，其中含较多修饰成分，结构上也有很多保守区。其二级结构尚未研究清楚。

8.4 DNA和RNA的性质

8.4.1 DNA的物理性质和解离性与稳定性

(一)DNA一般是双链螺旋结构大分子,相对分子质量为$10^6 \sim 10^{12}$。双链中碱基对数目有$10^3 \sim 10^{11}$。链长1μm~10μm,长度与直径比达10^7左右。DNA通常是具有一定卷曲度的线性分子。它们的水溶液有很高的粘度,加热或其它处理后破坏螺旋结构而使DNA分子变性时,其粘度会下降。

(二)DNA分子具有很大的沉降常数(图8-17 $S^{\circ}_{20,w}$)和浮力密度,通常可采用氯化铯密度梯度离心技术测得DNA的浮力密度,并由此得到DNA中G—C含量的信息,以利于区分单链DNA和双链DNA。

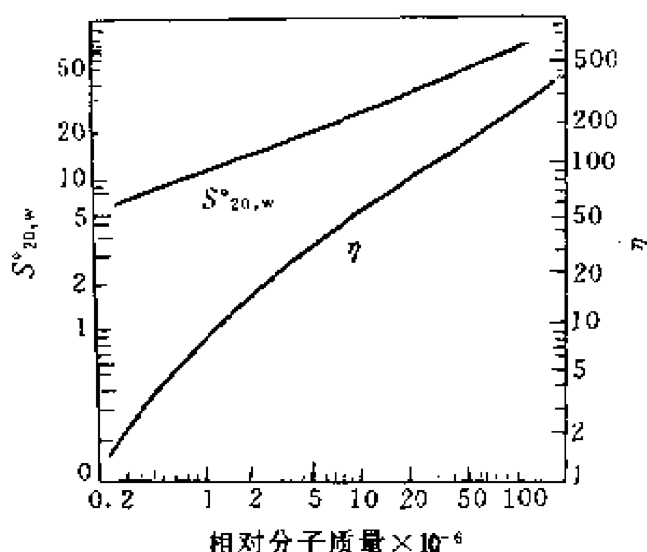


图8-17 DNA相对分子质量和粘度(η)及沉降常数(S)的关系

(三)DNA在紫外区有强吸收,最大吸收峰位于260nm处,据此260nm光吸收值可对核酸进行定量测定。但由于DNA分子太大而且大小不同,很难以其摩尔消光系数表示。然而通常可用摩尔原子

磷消光系数[$\varepsilon(p)$]计算,即

$$\varepsilon(p) = A_{260}/Cl \tag{8.4-1}$$

式中　C——代表磷原子的浓度,$mol \cdot dm^{-3}$;

　　　l——代表光径。

DNA 的 $\varepsilon(p)$值一般为 $6\times10^3 \sim 8\times10^3$,它比其所含的核苷酸在单体时的 $\varepsilon(p)$值总和要低,降低的程度可能部分和双链结构有关。DNA 变性后 $\varepsilon(p)$值升高,表现出"增色效应",而复性后 $\varepsilon(p)$又恢复到原来的水平,这被称为"减色效应"。

(四)多聚核苷酸的 DNA 是一种多元酸,其末端 5′-磷酸基有二个能离解的 H^+,它们分别是 $pK_1 \approx 1.5$ 和 $pK_2 \approx 6.0$。磷酸二酯键中的磷酸基也可离解,pK 值为 1.5 左右。在通常的 DNA 抽提溶液中,这些磷酸基全部处于离解状态,因此呈现较强的酸性。于是多阴离子的 DNA 可与金属离子成盐,也可与多阳离子的碱性蛋白、组蛋白、亚精胺等结合。

DNA 的碱基有部分以氢键组成碱基对(bp)而形成双螺旋结构的维系作用力,所以 DNA 中的碱基离解性能受到氢键形成和稳定的密切影响,因此溶液的 pH 值能直接影响 DNA 的稳定性。DNA 的 pH 稳定范围一般是 4～11,其等电点在 3 左右。

8.4.2　DNA 的变性和复性

(一)DNA 的变性

DNA 双螺旋结构的破坏称为变性,这和蛋白质的二级结构变性一样,多聚核苷酸二酯键的断裂不属于变性范畴。由于 DNA 双螺旋结构主要靠氢键和疏水相互作用力维系,因此凡是能破坏氢键和疏水作用力的因素就会引起 DNA 变性,例如加热,加入酸或碱、一些有机溶剂、脲或胍等。不过,DNA 高级结构变性的难易(即结构的稳定性)除与外部影响因素有关外,还取决于它本身的结构,例如在 DNA 中核苷酸的顺序排列所组成的 G、C 对含量高的,就相对的较稳定,环状双链 DNA 比线性 DNA 不易变性。

DNA 的变性是双螺旋结构变为无规线团的结果,因此随着变性

DNA 溶液的流体力学性质亦会发生变化，例如粘度降低、沉降常数和浮力密度增大。DNA 中某些碱基从氢键中解脱而暴露出来，导致紫外吸收增高而呈现增色效应。变性会使 DNA 失去生物活性。

DNA 的热变性过程可用跟踪升温过程所呈现的增色效应来获得信息。图 8-18(a)是以紫外吸收值对温度作图来表征热变性过程的，一般由此能得到一条 S 形曲线，很陡部位发生在相当狭的温度范围内，在这一紫外吸收值跃变的温度范围中点称为热变性温度，可以认为这是 DNA 的“熔点 Tm”，也说明变性过程可用紫外吸收值的跃变过程来检定。如果用跟踪升温过程所呈现的流体力学性质——粘度变化也能得到类似的曲线［图 8-18(b)］，同样，曲线跃变区的中点温度为 DNA 熔点(Tm)。在 Tm 值左右范围内 DNA 的粘度急速下降。

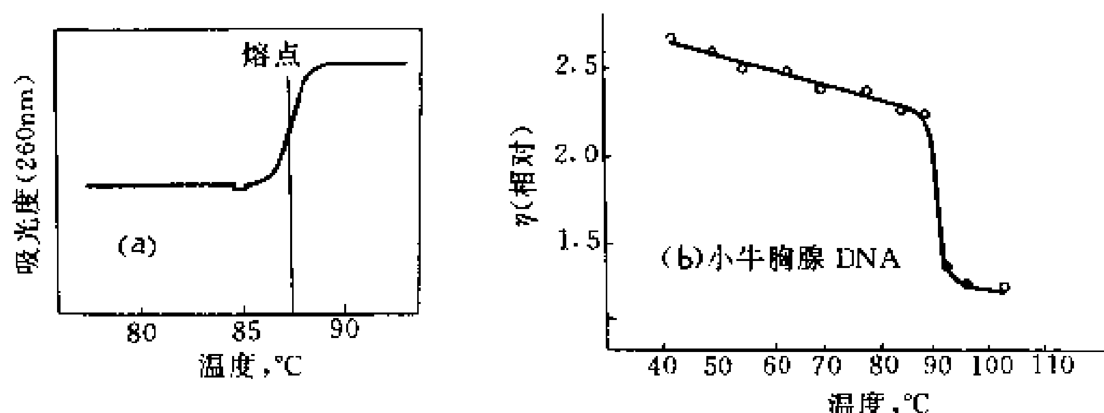


图 8-18

(a)DNA 变性与紫外吸收的增色效应；(b)DNA 变性与粘度变化。

（二）影响 DNA 变性过程的因素

DNA 的热变性过程及其熔点是与多种因素有关。通常，Tm 的高低和 DNA 分子中 G－C 对含量是成正比关系，可参见图 8-19，并以下述经验式表达：

$$\%(\text{G}-\text{C 对}) = (\text{Tm} - 69.3) \times 2.44 \qquad (8.4\text{-}2)$$

介质的离子强度亦会影响变性过程，Tm 往往随离子强度升高而升高，即在较高的离子强度环境下 DNA 较稳定。图 8-20 显示了

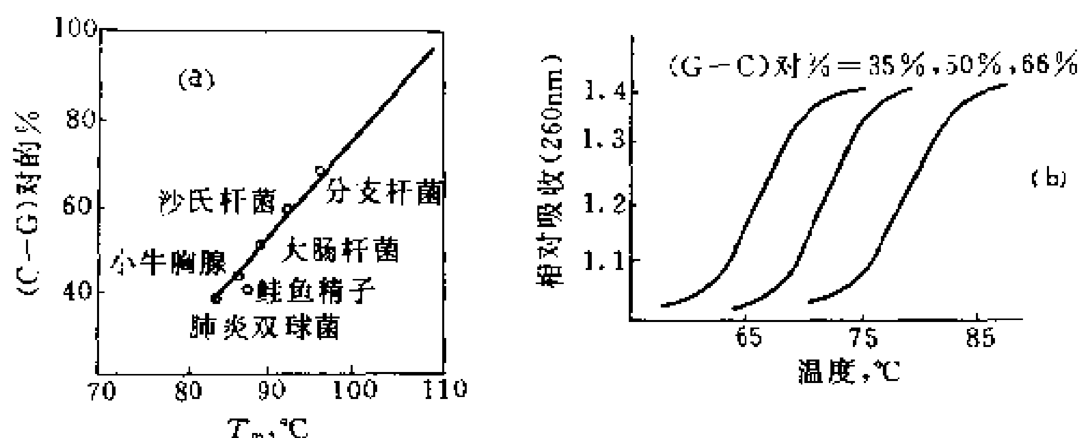


图 8-19　DNA 的 Tm 与其(G-C)对含量的关系

(a)各种来源的 DNA 所含(C-G)对的%与 Tm 关系;(b)各种(G-C)对%影响下 260nm 紫外相对吸收随温度的跃变曲线。

DNA 热变性与溶液(含 KCl)离子强度的关系。所以在极稀的盐溶液中,DNA 是不宜保存的。

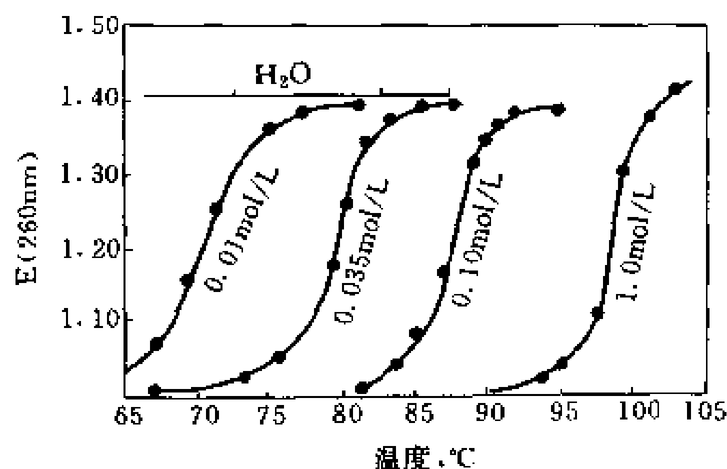


图 8-20　大肠杆菌 K 12-细胞的 DNA 热变性与溶液(KCl)离子强度的关系

介质的离子强度不仅影响 Tm 的高低,而且也影响 S 形曲线的陡度,较低的离子强度时,DNA 的熔解温度范围也较宽。然而仅根据 S 形曲线的陡度不能判定离子强度的高低,因为 DNA 的均一性影响着 S 的陡度。然而在某些情况下,S 形曲线的陡度却可用于判

断 DNA 的均一性。例如人工合成的多聚核苷酸 Polyd(A－T)、Poly(G－C)及某些病毒等较均质 DNA，其熔解温度范围较窄，而异质 DNA 的熔解过程具有较宽的温度范围。

在研究中发现，一定条件下的 DNA 变性可以一个区域一个区域地进行，富含 A－T 对的区域最容易先发生变性。从电子显微镜下可以观察到双链和变性区域形成小泡的相隔现象。因此，利用这种 DNA 局部先后变性图谱的不同来识别 DNA 中特定基因的位置。

（三）DNA 的复性

DNA 变性后的二条链，在消除变性因素后，仍可通过碱基配对互补重新缔合为原来的双螺旋结构，这种过程称为复性。伴随复性，DNA 的一系列物理化学性质得到重现，生物活性也可能部分甚至全部恢复，粘度增高，浮力密度下降，在紫外吸收方面表现减色效应，于是复性过程通常也可借紫外吸收值的变化进行跟踪。

复性过程是二条链恢复双螺旋结构过程，因此它是双分子反应，就可用二级反应动力学描写，即 $S\text{—}DNA + S'\text{—}DNA \xrightarrow{k} d\text{—}DNA$

$$dc/dt = -kc^2 \qquad (8.4\text{-}3)$$

S—DNA 和 S′—DNA 分别代表完全变性后双螺旋解散成的二条单链，它们的摩尔浓度应相等，如以 C_o 和 C 分别表示单链 DNA(S—或 S′—)在起始(t＝0)时和 t 时的摩尔浓度(以核苷酸摩尔浓度表示)，于是可从 t＝0 到 t 时的 C_o 变化到 C 来积分而得

$$\frac{C_o}{C} = 1 + kC_ot \quad 或 \frac{C}{C_o} = 1/(1 + kC_ot) \qquad (8.4\text{-}4)$$

当 DNA 复性一半即 $C/C_o = \frac{1}{2}$ 时，则

$$t_{\frac{1}{2}} = 1/kC_o \qquad (8.4\text{-}5)$$

式中　k——代表反应速度常数，也就是复性速度常数；

$t_{1/2}$——代表 DNA 半复性时间，以秒为单位。

C/C_o 对 C_ot 作图可得到一条 S 曲线，曲线的中点为 $C_ot_{1/2}$(图 8-21)。

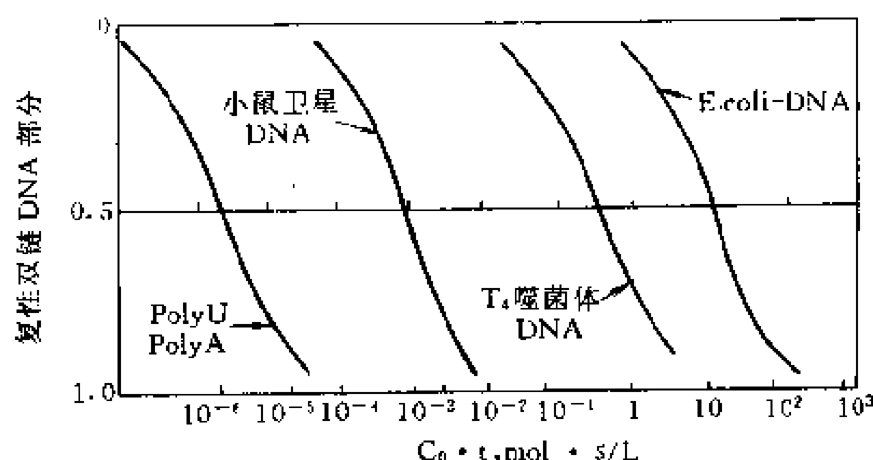


图 8-21 DNA 的复性曲线

复性是一个多步骤的过程,首先需要某个区域能配位互补的碱基形成双链核心,然后配对范围扩大直至复性完成。双链核心的形成是全复性过程的限速步骤和关键环节。

(四)影响 DNA 复性的因素

DNA 复性的影响因素很多,一般有:(1)能否完全恢复到变性前原生物活性是与 DNA 结构的复杂性有关,结构越复杂,碱基误配的几率就越大,还可认为复性的速度常数与 DNA 的复杂性成反比,因此,通常顺序简单的 DNA 比顺序复杂的,高度重复顺序的 DNA 比单拷贝序列的,均质的 DNA 比异质的,复性速度较快,复性就越容易;(2)小片段复性比大片段复性快;(3)增高浓度,可加速复性,从(8.4-5)式可知,其半复性时间 $t_{1/2}$ 会缩短;(4)温度升高使复性速度常数 $k=Ae^{-\frac{E}{RT}}$ 增大,有利于复性。低温不仅使复性缓慢,而且碱基误配片段的修正也就困难。通常复性温度不能太低,以逐步缓慢地降低至比 Tm 低 25℃左右为宜;(5)高盐浓度条件下复性较快。

在促使 DNA 复性的实际操作中,务必提供变性的 DNA 在复性的这一转变过程时所需要满足的相当缓慢地进行复性的条件。如果是热变性的 DNA,则只有在逐渐非常缓慢地冷却条件下才能复性。骤冷往往会导致氢键重新形成时误配而呈无规则构象,不能实现复性的目的。然而即使提供了复性的环境,复性后的 DNA 也不一定

能完全回复到原来天然的结构状态，于是 DNA 的生物活性也不一定能得到完全复原。因为不同变性的 DNA 片段之间会通过碱基互补配对进行所谓杂交的“复性”，这种杂交不仅可以发生在 DNA 与 DNA 链间，也可在 DNA 与 RNA 链的同源序列之间进行。

研究复性过程所发现的杂交技术已广泛地应用于 DNA 的研究中，成为研究 DNA 结构与其功能关系的一种有力手段，如研究特定基因的频率和异源 DNA 的相似程度，以及与电镜配合来研究基因的组织顺序，测得基因定位，探索真核生物中 DNA 的插入顺序等。

8.4.3 RNA 的性质

RNA 类似于 DNA，也是多聚核苷酸，在结构上或多或少具有部分双螺旋构象，因此在物理化学性质上 RNA 与 DNA 很相似。然而，在结构上 RNA 与 DNA 毕竟有些不同，因而性质上也有小的差异，例如 RNA 溶液也有高的粘度，但相对于 DNA 溶液，其粘度要小得多。RNA 的摩尔原子磷消光系数 $\varepsilon(p)$ 值为 7000～10000，略大于 DNA。RNA 浮力密度比双链 DNA 更高。

RNA 也有变性和复性现象，其变性曲线较平坦，Tm 也较低。tRNA 的变性过程由于它具有较多的双螺旋区域，Tm 相对地要高些，变性曲线的变化会陡些。

8.5 核酸和蛋白质的结合结构

核酸往往在某些生物分子中与蛋白质结合而构成复合物，从而呈现出生物活性，其中有病毒、染色质和核糖体等。

8.5.1 病毒(Virus)

病毒可划归为最原始生物的范畴。一个完整的病毒单位(virion)称作病毒粒子，可参阅 7.5.3 节的图 7.15。它是由核酸和蛋白质结合所组成的，核酸分子链盘绕着集中在病毒内部，蛋白质形成所需的营养，按照病毒核酸的指令合成新的病毒而繁殖，并代谢出不需要的毒素。由此可见，核酸是在病毒中起着生理的决定作用，而蛋白

质在病毒粒子中可能起着帮助病毒实现专属性感染寄生和保护核酸及其病毒的生存与繁殖。

病毒可分为含 DNA 病毒和 RNA 病素，又根据寄主的不同，病毒分为噬菌体、动物病毒和植物病毒等三类。

(一)噬菌体

它是以细菌为寄主，在只含 DNA 的病毒中有的是双链 DNA，例如 T 偶系噬菌体，其核酸集中于多面体形成圆形的头部，它还有一条带尾丝的尾部。感染时核酸通过穿透细菌膜而插入寄主细菌，外壳留在寄主细菌膜外。

还有含单链 DNA 的病毒，它们或为球形或为细丝状，前者例如 $\phi\times174$ 病毒，后者例如噬菌体 fd。噬菌体 M 13是一种约含 6500 个核苷酸，单链闭环形式 DNA 所构成的细丝状噬菌体，在感染寄主细菌之后，单链 DNA 噬菌体转变为双链复制形式，这种双链 DNA 可以在细胞内积累达 100～200 拷贝，然后进行不对称合成(即这些双链 DNA 中只有一股大量地复制)，并最后形成新的单链 DNA 噬菌体粒子释放出来。当感染到寄主细菌内转变为双链复制形式的噬菌体 DNA 时，能分离出来作为双链 DNA 载体，这一性质可能是使双链 DNA 能在细菌内积累的因素。

根据上述 M13 的特点，应用 M13 在 DNA 重组、DNA 顺序分析以及作用位点的定位突变的研究中起着重要的作用。

仅含 RNA 的噬菌体通常都为球形，例如 MS_2 等。

(二)动物病毒

它们的结构较为复杂，病毒粒子一般较大，例如流感病毒、疱疹病毒等。它们的组分中除了核酸和蛋白质外，还含有形成脂蛋白被膜的脂类和糖类物质，而糖蛋白在被膜表面上突起，以参与感染识别等过程。

动物病毒中含 DNA 病毒的有多瘤病毒、疱疹病毒、腺病毒和猴病毒 SV-40 等，它们都是含双链 DNA 的。

含 RNA 的病毒有流感病毒、劳氏肉瘤病毒、呼肠孤病毒等。

研究肿瘤发生机理的学者据病毒致瘤的病例曾提出一种学说，认为肿瘤是病毒引起的，它们一般是含 RNA 病毒，其中所含的 RNA 能以异常基因的形式参与到动物基因组内，然后在某种因素的诱发下导致细胞异常转化为癌细胞。并且由于这种病毒的再感染而引起转移扩散。如果有对付肿瘤病毒的活性噬菌体存在，可促使这种肿瘤病毒代谢而将癌细胞化解掉。

(三)植物病毒

绝大部分是含 RNA 病毒，大多数呈棒状，一般比动物病毒小些。其中有一些是双链 RNA 病毒，例如水稻矮缩病毒。前节提及的烟草花叶病毒(TMV)是单链 RNA 的。

现在已知的花椰菜病毒是含 DNA 的植物病毒。

8.5.2 染色质(chromatin)

DNA 能与组蛋白(histone)紧密结合，可构成核酸蛋白质络合物，在生物界称作染色质。组蛋白是属于一类小的碱性蛋白，它与核酸的质量在染色质内几乎是相等的。

如果用盐或稀酸处理染色质，可以将组蛋白分离出来，再通过离子交换层析提取，得到的是五种不同组蛋白：即 H_1、H_2A、H_2B、H_3 和 H_4，相对分子质量为 11000～21000，共同特点是都含约 1/4 的碱性氨基酸如赖氨酸或精氨酸，而具有高含量的可带正电荷侧链基团。与 DNA 结合的每一种组蛋白都可以几种形式存在，因为它们的侧链基团能被乙酰化、甲基化、ADP-核糖苷化和磷酸化等修饰。这些修饰对它们的电荷性质、氢键数目和构象等有重要的影响，还能对 DNA 在复制和转录方面起调节作用。

与 DNA 结合的组蛋白除了 H_1 外，其余几种的氨基酸顺序一般都有很强的保守性，特别是 H_3 和 H_4 的氨基酸顺序在所有动物和植物中基本相同。

根据电镜观察、X-射线和中子衍射测试、核酸酶酶切分析以及重组试验等，均表明染色质具有念珠状的结构，图8-22示意念珠状染

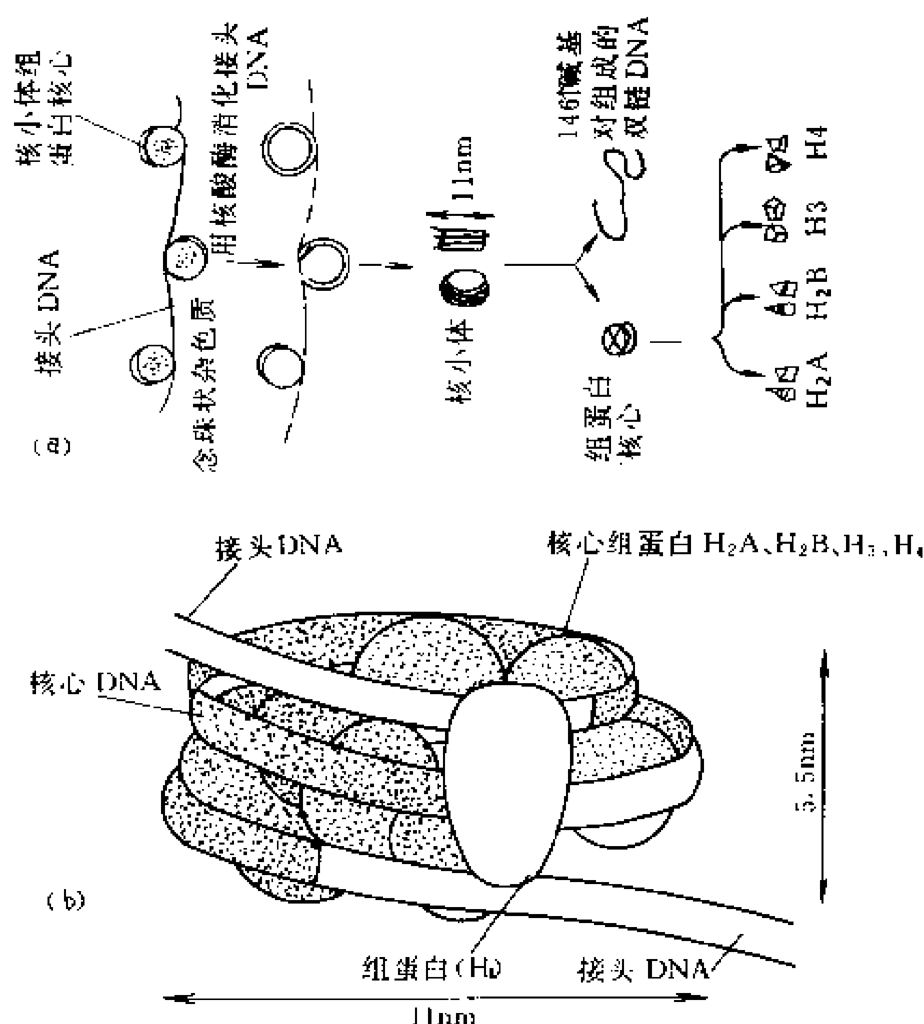


图 8-22　染色质结构示意

(a)染色质念珠状结构及其“念珠”核小体组成分析示意；

(b)核小体组成示意。

色质结构与其核小体组成。图示出染色质的基本单位为“念珠”核小体(nucieosome)。核小体直径约 10～11nm，其核心是由 2 个 H_2A、2 个 H_2B、2 个 H_3 和 2 个 H_4 组成的蛋白八聚体(故称组蛋白)，体积约 11nm×11nm×5nm。组蛋白以二层扁平颗粒构象构成核心，在核心外有以左螺旋方式环绕 $1\frac{3}{4}$ 圈由 140 碱基对组成的 DNA 双链，螺距约 2.8nm。在环绕核心的 140 碱基对组成链的两端还连接有称为接头的约 60 个碱基对所组成的 DNA 双链。这样将相邻核小体一个

个连成"念珠"形构象，使染色质纤维具有一定的柔顺性。组蛋白 H_1 很容易从核小体上解脱下来，估计它是附着于核小体外并不参与核小体核心的组成。H_1 与核小体的计量关系是 1∶1，它的附着可能是起着促使染色质压缩成凝集型的作用。可参见图 8-23。

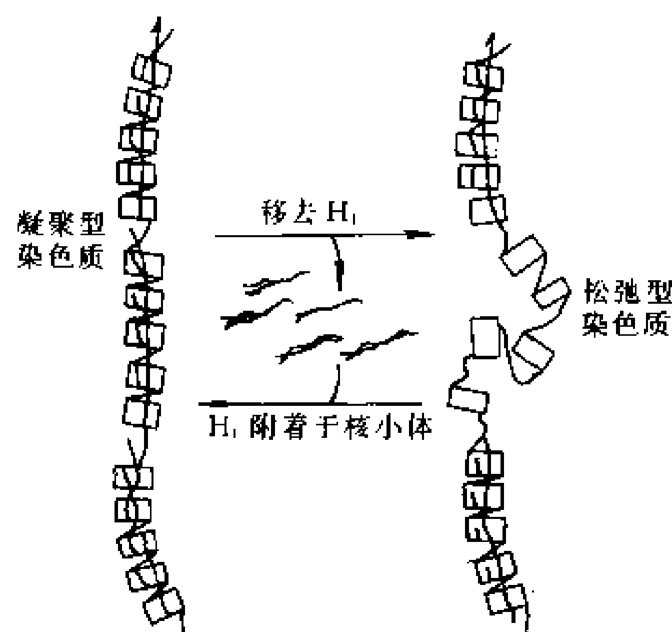


图 8-23　组蛋白 H_1 附着核小体示意

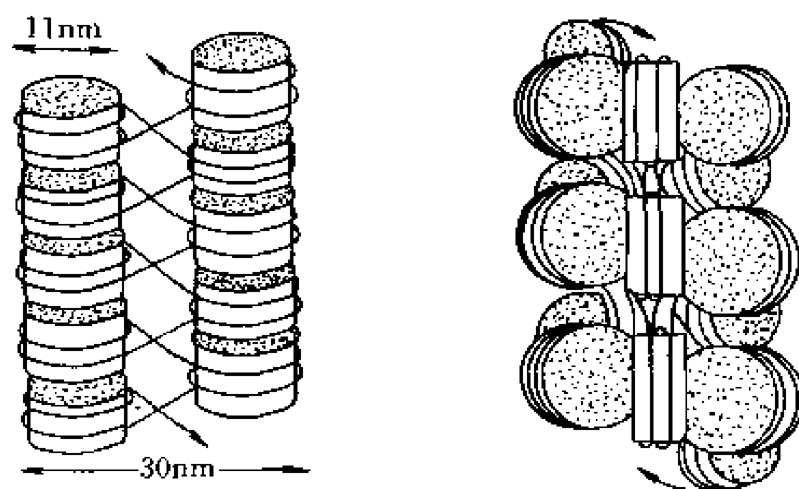


图 8-24　染色质的两种压缩方式

核小体的形成使 DNA 的线性长度得到大大地压缩，例如一条 200 个碱基对的 DNA 链在溶液中的长度为 68nm，组成核小体后绕

成直径约 10～11nm 的颗粒。在研究中发现，染色质在染色体内还会进一步压缩，于是提出染色质本身能形成螺旋而呈现直径约 36nm 的圆筒状，这种圆筒还可折叠成环状(图 8-24)，这种高级结构再借助非组蛋白而得到稳定。染色质的如此压缩凝聚形成的高级结构可能和基因表达有密切关系。

人细胞分裂的染色体中含有 5.3×10^9 碱基对的 DNA 链，其总线长为 1.8m，经包装 DNA 成 46 个圆柱体后，长度只有 200μm。

8.5.3 核糖体(ribosome)

在研究大肠杆菌的核糖体中发现，它的相对分子质量约 2.5×10^6，沉降系数为 70S。它是由二种亚基组成结构特殊的颗粒，能在解离时分为 50S 的大亚基和 30S 的小亚基。大亚基由 23S RNA 与 5S RNA 和 34 种蛋白质组成，小亚基由 16S RNA 和 21 种蛋白质组成。整个核糖体是 2/3RNA 和 1/3 蛋白质结合而构成。

真核细胞的核糖体更为复杂，沉降系数为 80S，解离时分为 60S 大亚基和 40S 小亚基，可参见图 8-25。大亚基包含 28S、5.8S 和 5S 的三种 RNA，小亚基只含 18S RNA 一种。真核生物的核糖体包含约 70～90 种蛋白质。

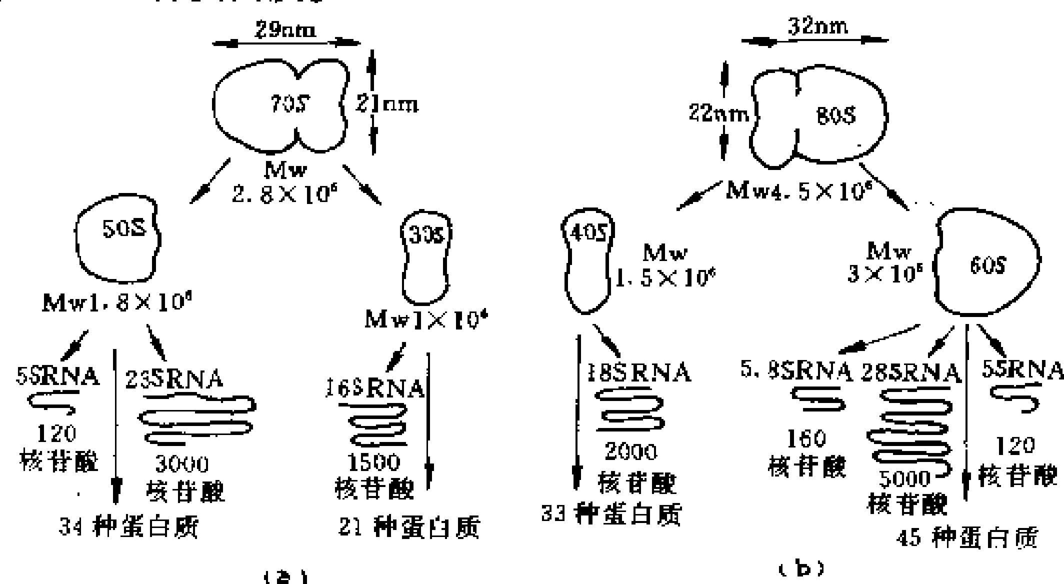


图 8-25 核糖体组成示意

(a)原核生物核糖体；(b)真核细胞核糖体。

经重组实验等研究核糖体中各组成成分的作用后，认为它是担负蛋白质合成的细胞器，而负责蛋白质生物合成催化活性中心都在大亚基上。小亚基的功能是 mRNA 的专一结合。例如对原核生物核糖体的 30S 小亚基的研究发现，16S rRNA 在核糖体的装配和功能上都是必需的，而且不同源的 16S rRNA 是不可替代的，即如酵母的 16S rRNA 是不能代替大肠杆菌的 16S。在 21 种蛋白质中至少有 6 种蛋白质对装配是必需的，除 16S rRNA 外，21 种蛋白质中大部分对组成活性的 30S 亚基是必要的，据此推定 30S 亚基是 RNA 和蛋白质结合的一种功能协同的整体。

8.6 核酸的分离与检测

核酸的分离纯化和检测分析是研究核酸的结构和功能的关系，研究基因表达和调控，以及生物基因工程等的基础，分离是分析的前提。

8.6.1 核酸的分离和纯化

核酸的分离要注意尽量保护核酸结构的稳定性和功能的完整性，应该尽可能消除分离过程中细胞释放的核酸酶对它的降解作用。RNA 在分离时的降解较难避免，必须特别注意。还有要注意分离时机械作用引起的剪切效应等物理因素的破裂作用需避免，这对于 DNA 分离时特别重要，此外，环境的酸碱不当会引起核酸的降解，也应调整好溶液达到适当的 pH 值。核酸的分离可分为三个基本步骤：破碎细胞和提取核酸；去除蛋白与多糖等物质；针对核酸的特点实现纯化。

(一)DNA 的分离纯化

根据来源不同的 DNA，需采取不同的分离纯化方法。

(1)病毒 DNA

通常，一个病毒只有一种核酸，病毒的 DNA 分子较小，机械剪切等影响不大，病毒外壳易除去，所以病毒的 DNA 分离纯化比较简

单，有先分离病毒粒子和直接抽提 DNA 两种技术措施。

先分离出病毒粒子的技措有两个步骤：第一步是先用 CH_3Cl 等或用机械办法将宿主细胞加以破碎，然后用 DNase，RNase 及蛋白酶除去细胞核酸和蛋白质，再通过细菌漏斗过滤或经超离心法收集病毒；第二步通常先用水饱和的酚与病毒粒子一起振动摇荡，除去外壳蛋白将 DNA 抽提出来，再通过甲基白蛋白硅藻土（MAK）柱或超离心技术将 DNA 纯化。

直接抽提措施是先用十二烷基硫酸钠-乙二胺四乙酸（SDS-EDTA；0.6％SDS，0.01mol/L EDTA，pH＝7.5）溶液处理病毒。SDS 能破碎细胞，并使 DNA 从病毒蛋白中解释出来。EDTA 能螯合 Mg^{2+}，Ca^{2+} 等而抑制 DNase 的酶促降解作用。然后加 NaCl 至 1mol/L 使寄主细胞的 DNA 沉淀，而让小的双链环状 DNA 留存在上清液中，在此清液中加等量的 0.1mol/L Tris（三羟甲基氨基甲烷，pH＝8.0）饱和的酚除去蛋白，离心后取上清液，加醋酸钾（pH＝6.6）至 2%，再用 2 倍体积的酒精沉淀 DNA，最后加 SSC 溶液（0.15mol/L NaCl，0.015mol/L 柠檬酸钠）处理，可得纯化的 DNA。

（2）细菌质粒 DNA

细菌的 DNA 抽提，通常办法是采用溶菌酶〔有时还需加些巯基保护剂，如二硫苏糖醇（DTT）或 8.0mol/L 脲〕，破碎细胞而从中提取 DNA，再在酸性条件下用酚处理，直链或开环 DNA 进入酚相，共价闭环 DNA（$_{ccc}$DNA）转入水相中。

另一种提取细菌 DNA 的方法是在 0℃ 时用溶菌酶处理细菌 5min，再用 0.2mol/L NaOH-SDS-EDTA 破碎细胞并使 DNA 变性，然后加醋酸钠中和，让$_{ccc}$DNA 复性，染色体 DNA 仍保持在变性状态，并和 RNA、蛋白质一起与 SDS 形成络合物沉淀，最后再用羟基磷灰石或分子筛进一步纯化。

（3）动植物 DNA 的分离

提取动植物 DNA 需要在破碎细胞时不破坏 DNA 的完整性，然后在抽提到的 DNA 中用一种广谱的又不受 SDS-EDTA 抑制的蛋白

酶 K 处理，又经酚处理和 RNaseT_2 与 RNaseA 再处理后即能得到纯化的 DNA。

(二)RNA 的纯化

RNA 的纯化技措可以 mRNA 为例，原核细胞的信使核糖核酸实现纯化比较困难。它一般是多顺反子，3′端没有多聚的 A，半寿期短，通常只能采用分子杂交法获得同位素水平的量。

真核细胞的 mRNA 纯化，可以利用它具有 3′端多聚 A，又是单顺反子，半寿期长和真核细胞分化程度高等的一些特点。如果有的组织只含一种或很少几种蛋白质，就容易得到单一的 mRNA。抽提时通常所采用的措施可归纳如下：从整个细胞中直接抽提；除去相应的细胞器后再抽提，将核糖体分离出来后再抽提等。更多的是采用第三种措施。在分离核糖体时，为了避免多糖体分离成亚基，要维持 Mg^{2+} 在 10mmol/L 的水平上。然后在务必防止 RNase 对 mRNA 的降解情况下用酚-氯仿-SDS 体系进行抽提。mRNA 的纯化有很多种方法，例如：

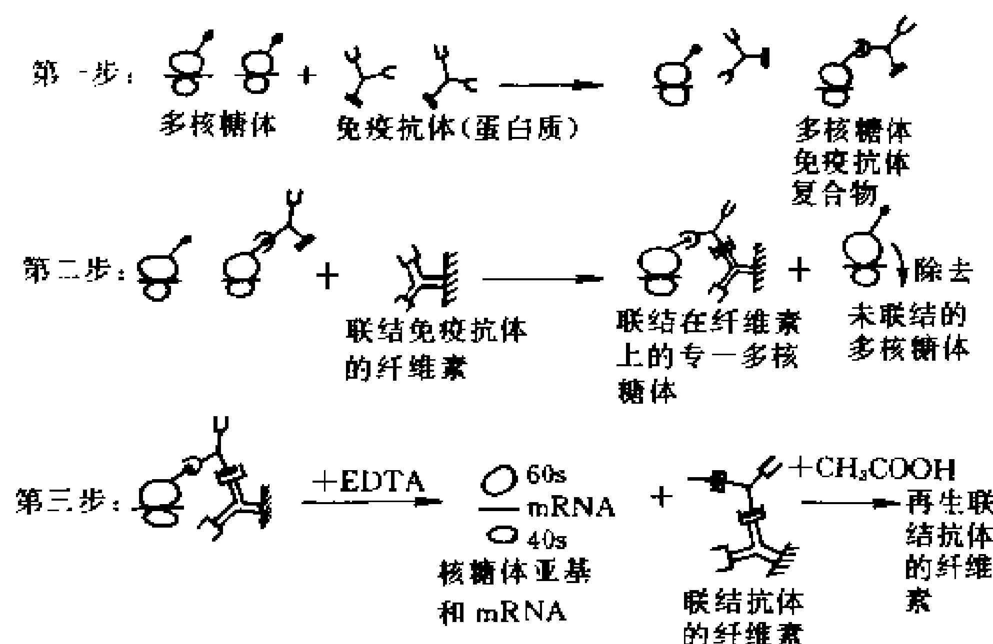


图 8-26　双抗免疫分离法纯化 mRNA 的示意图

(1)利用 PolyA 的特点进行寡聚 dT(oligo dT)纤维素或多聚 U (poly U)-琼脂糖柱的亲和层析;

(2)采用双抗免疫分离法,即利用新合成的蛋白质链往往和 mRNA 部分结合在核糖体上的特点,先将核糖体分离出来,然后从其中纯化 mRNA,图 8-26 扼要地示意该过程;

(3)分子杂交法,即利用 cDNA 与 mRNA 杂交进行纯化。

其它的技措还有超离心法和电泳法。

8.6.2 核酸的检测

生物样品中的核酸进行测定时,通常还必须预处理,以除去核酸外的影响物质,然后进行定性检测、定量测定、图谱分析、核苷酸顺序鉴定等。

(一)定性检测

核酸定性检测常用的有两类方法,即凝胶电泳和超离心法。

凝胶电泳对核酸的分离和分析是非常重要的方法,各种大小的分子都能通过如此的方法而实现分离,且具有高分辨力,操作又简便。由于核酸电泳主要与所含磷酸有关,而各种核酸的相对分子质量与其所含磷酸的比值基本相近,于是核酸的凝胶电泳主要取决于核酸分子的大小和分子的构象。根据检测对象和需要,可拟定凝胶电泳的措施和条件。在通常情况下多采用琼脂糖胶电泳或聚丙烯酰胺胶电泳。

对于较大的 DNA 分子或片段,例如相对分子质量范围约在 5×10^4 以上的一般采用 0.1%~2.5% 的琼脂糖胶。

对于较小的 DNA 分子或片段,或 mRNA 和 tRNA 等,例如相对分子质量范围约为 $3\times10^2\sim1\times10^6$ 的,适用 2.4%~20% 的聚丙烯酰胺胶。为了增加胶的强度,可在聚丙烯酰胺胶中加入一定量的琼脂糖胶。

如果要分离检测相对分子质量分布范围较广的生物样品,可将聚丙烯酰胺胶配成连续的浓度梯度凝胶,让样品先经稀胶再进入浓胶,一般所得效果较好。

核酸在凝胶电泳中的迁移率(核酸在电场中迁移的电量与通过

凝胶总电量之比),通常与相对分子质量的对数呈线性关系。然而,核酸构象可能影响迁移速度。对于DNA相对分子质量相近的情况下,共价闭环DNA的电泳速度大于线性DNA的,而线性DNA的电泳速度大于开环DNA的。为了使凝胶电泳完全按照分子大小进行分离检测,需要消除构象的影响,为此采取核酸变性的技措而发展了变性胶电脉。在凝胶内加入的变性剂中已广泛应用的有:(1)甲基氢氧化汞;(2)7mol/L的脲;(3)98%甲酰胺等。甲基氢氧化汞在水溶液中离解成CH_3Hg^+,能促使DNA和RNA变性,用于聚丙烯酰胺胶和琼脂糖胶中需要的浓度很低;脲变性剂大多应用于核酸小片段核苷酸(10~150个)的电泳分离;甲酰胺适用于150~1000个核苷酸组成的核酸分离。这些变性剂还可用于mRNA的电泳分离以阻止mRNA的自身凝聚。

倘若联合使用琼脂糖胶电泳和连续变性聚丙烯酰胺胶电泳,会提高按分子大小进行分离的分辨能力,甚至可分离片段数达10^3。

超离心法广泛应用于核酸的分离检测,它不仅可测定核酸相对分子质量,而且也能测定分子的形状、大小和密度。如果采用密度超离心法是在CsCl或Cs_2SO_4密度梯度溶液中进行离心,根据核酸停留在密度梯度中的位置可得知其密度。若采用速度超离心法,不同相对分子质量(或大小)的核酸在离心过程中以不同速度沉降,根据沉降速度可求出沉降常数S。利用超离心沉降平衡法公式可算得其相对分子质量。

(二)核酸的定量测定

核酸的定量测定方法可采用紫外光吸收法,定磷法和定糖法等。使用这些方法时需要样品预处理除去核酸以外的紫外吸收物质、含磷或含糖物质。

样品预处理内容包括细胞破碎,酸、酯溶剂抽提等。在避免细胞破碎过程中核酸酶对核酸的降解和机械作用而对核酸的剪切前提下,根据不同生物材料选用不同的细胞破碎方法。细胞破碎后通常先用5%~10%的冷高氯酸(PCA)或三氯乙酸(TCA)抽提,除去一

些小的核苷酸之类的酸溶性物质，再用氯仿、乙醚等抽提，移去磷脂类等衍生物，最后根据情况选用热酸法、冷酸法或碱法对核酸抽提，近年来还开拓了一些新技措。

热酸法是用5%～10%的PCA或TCA在90℃处理15min，除去大部分不溶性蛋白，并将DNA和RNA等核酸一起抽提出来。

冷酸法是先用10%PCA于4℃处理18小时后抽出RNA，再用5%PCA在70℃处理20min抽出DNA。

碱法是先用1mol/L NaOH在37℃处理过夜约24小时左右，使RNA降解为酸溶性核苷酸，再用PCA中和，使未降解的DNA沉淀。

紫外光吸收法是利用核酸在260nm有吸收峰，测定260nm的光吸收值。借此计算样品中核酸的含量。

定磷法一般采用钼蓝比色法，此方法先将核酸中磷酸脱出，然后在酸性条件下加钼酸与其反应生成磷钼酸，再加还原剂生成磷钼蓝后，即刻以分光光度计在660nm处测定含磷量。根据RNA和DNA平均磷含量分别为9.4%和9.9%，估算出核酸含量。

定糖法可利用二苯胺与DNA在酸性条件下共热时发生反应，从而能定量地生成波长595nm处有最大吸收峰的蓝色化合物，对于RNA，可用地衣酚法，由于RNA在用盐酸加热处理下能降解为核糖，然后转化为核醛，于是就可与随后加入的地衣酚生成在670nm处有最大吸收的绿色化合物。

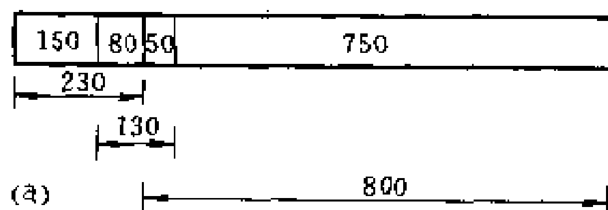
8.7 DNA片段的排列顺序图谱分析

DNA片段排列顺序图谱意指DNA在限制性内切核酸酶酶解下的酶切片段排列顺序图解，因此图谱的绘制有很大的应用价值。通常，制作图谱的方法是选用相应的限制性内切酶对DNA分子进行完全酶切，并由凝胶电泳测出酶切片段数和各个片段的大小。（如能用放射性^{32}P进行完全标记，还可从各片段放射性与总放射性量之比获得更多信息。）另外再用相同的限制性内切酶对DNA分子进行

部分酶切，并同样通过凝胶电泳测得部分酶切片段数和相应片段的分子大小。根据重叠法分析即可推定出完全酶切所得各片段的排列顺序，于是就能绘制出该限制性内切酶的酶切图谱。

例如 φ×174 复制型 HindⅢ的一个酯切片段有 1030 个碱基对(bp)，用 AluI 完全酶切可得 4 个片段，各为 750bp、150bp、80bp 和 50bp，而部分酶切得到 810bp、750bp、230bp、130bp、150bp 等片段。应用重叠法分析，可推定该片段的酶切图谱的排列顺序是 150bp、80bp、50bp、750bp，见图 8-27。

如果部分酶切片段产率有时由于高级结构的影响而特别低，便需要使用第二种酶或多种酶进行交叉酶切。多种酶酶切即可得到多种限制性内切酶酶切图谱以便相互校对，使片段排列顺序的信息更可靠。不过，若部分酶切片段数目产生太多，会给分离带来困难，为此设法先将 DNA 的一端用放射性同位素标记，然后进行部分酶切和电泳分离。最后根据放射自显影图谱用重叠法绘出酶切图谱，见图 8-27(b)。



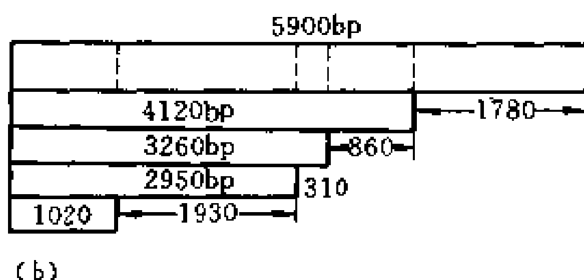


图 8-27

(a)酶解片段重叠法绘制图谱

(b)末端标记法测定的图谱

绘制片段排列顺序图谱还可采用酶切与电子显微镜测定结合的方法或引物脉冲标记法、双向杂交法、基团互补法等。

8.8 核酸的核苷酸顺序分析

核酸的核苷酸顺序分析是研究核酸结构与其功能关系的极其重要基础，也是分子生物学的基本研究课题。有关蛋白质顺序分析的裂解小片段重叠法不能直接应用于DNA的顺序测定。

8.8.1 DNA的核苷酸顺序分析

由于限制性内切核酸酶的发现与开发，以及高分辨力凝胶电泳技术的拓展，DNA顺序分析才得以实现。分子生物学研究工作者开发了能分别在4种碱基末端专一地进行切割的技措，并用40cm长的聚丙烯酰胺凝胶电泳系统而将100～200个核苷酸全部分开，分辨力能达到1个核苷酸。

DNA的顺序分析由于制取片段方法的不同，可分为酶法和化学法。

(一)酶法——加减法

首先在DNA聚合酶存在的情况下，以待测的单链DNA为模板，加入适当的引物，再加4种脱氧核苷三磷酸(dNTP)，其中一种用放射性同位素(如^{32}P)标记，DNA聚合酶会从引物开始合成一条与模板完全互补的DNA链。如果控制反应让合成产物中有各种长度的片段，然后从反应系统中除去未反应的dNTP，并将反应产物分成两份，一份作“加法”系统，一份作“减法”系统，而又将每一份再分成4小份。

(1)作“加法”系统的4小份中，每一份仅分别加入一种dNTP(如dATP)，由于缺少另外三种dNTP，存在的DNA聚合酶会发挥出3′-5′外切酶活性的作用，原来合成产物被降解直到加入的dNTP(如dATP)处为止，而得到的每一份产物片段都以加入的核苷酸(如dA)为结尾。最后将4份片段在同一凝胶板上分别进行电泳分离，并以

放射自显影，根据各片段(带)的长度，从电泳最前端依次顺读，即可定出各种核苷酸的位置和顺序。

(2)作"减法"系统的4小份中，每一份分别加入3种dNTP，缺少同样一种的dNTP，于是得到的片段仅少了缺加核苷酸的结尾。于是该系统中的DNA聚合酶是发挥合成作用，合成反应停止在所缺加的核苷酸前。在进行电泳分离后可根据片段长度判定出各核苷酸顺序，从而作为加法系统的补充和验证，参见图8-28。

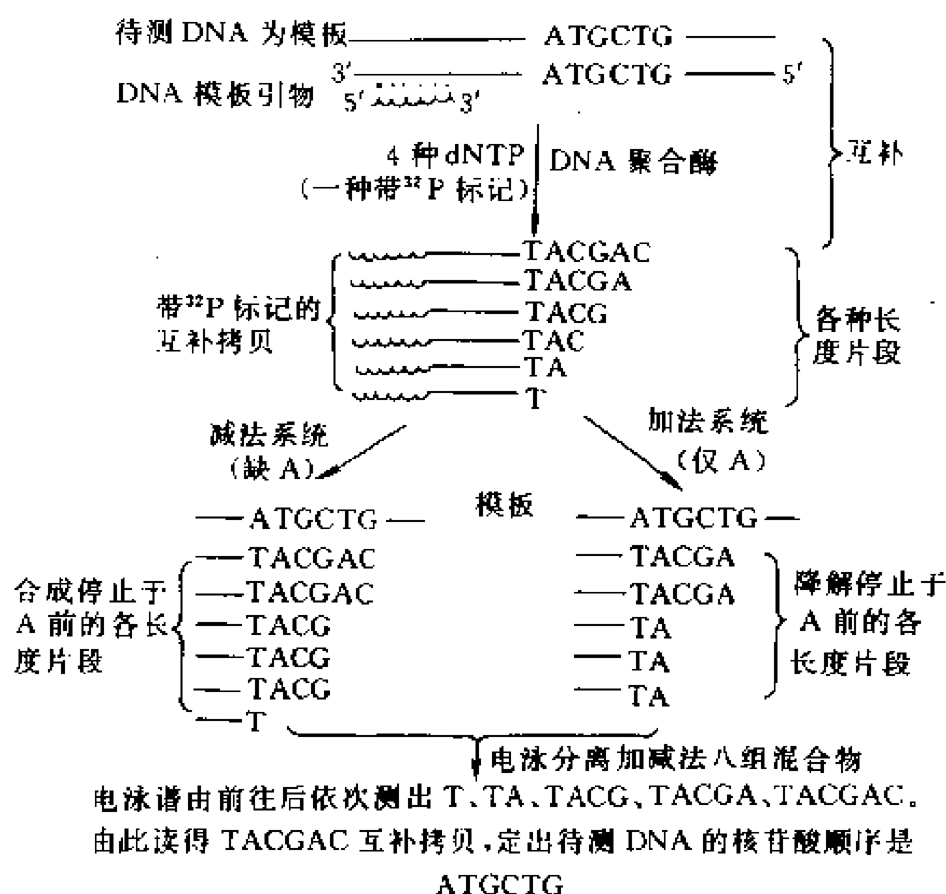


图8-28 酶法-加减法测定DNA排列顺序图示

酶法——加减法的进一步改进，开拓出末端终止法。该法除了使用模板、引物酶和4种dNTP外，尚按一定比例加入了某种2'3'双脱氧核苷三磷酸(ddNTP)。由于ddNTP代替了dNTP参加至合成产物后，合成反应即不能再进行，于是就得到一系列不同长度且以dd核苷酸结尾的片段。以电泳分离，通过直读，便能判定核苷酸顺

序。由此可见，它比原来的方法简化了。MB 克隆系统的应用，更进一步简化了单链 DNA 的分离和引物的制备。尔后又发展成 DNA 顺序连续测定法等。

（二）化学法

利用某些化学试剂能专一地修饰特定碱基，使相应的糖苷键变得不稳定而断开，即可得到以特定碱基结尾的 3 组片段（如表 8-5 所示）。这类试剂有多种，例如硫酸二甲酯（DMS）可使鸟嘌呤的N-7

表 8-5 DNA 顺序分析的化学降解反应

组	别	断裂部位	碱基修饰剂	碱基消除条件	链断裂条件
Ⅰ组	1	G>A*	DMS	pH7，加热	NaOH
	2	A>G	DMS	酸	NaOH
	3	C 和 T	NH_2NH_2	哌啶	哌啶
	4	C**	NH_2NH_2	盐＋哌啶	哌啶
Ⅱ组	5	G	DMS	哌啶	哌啶
	6	G 和 A	甲酸吡啶，pH2	酸	哌啶
	7	C 和 T	NH_2NH_2	哌啶	哌啶
	8	C	NH_2NH_2	盐＋哌啶	哌啶
Ⅲ组	9	A>C	NaOH	哌啶	哌啶
	10	G>A	DMS	pH7，加热	哌啶
	11	G	甲烯蓝	哌啶	哌啶
	12	T	四氧化锇	哌啶	哌啶

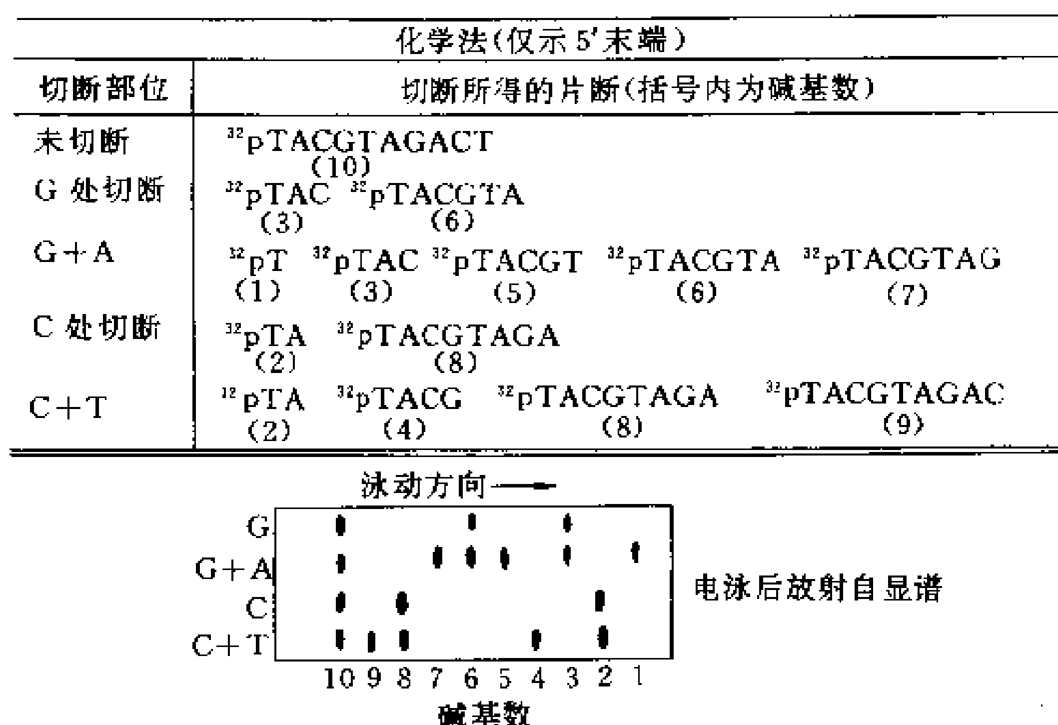
* 链断裂在按 5′→3′方向算起的 G 前比 A 前磷酸酯键（3′）处的几率大；

** 链仅断裂在按 5′→3′方向算起的 C 前核苷酸 3′磷酸酯键处；

其它同样含意。

和腺嘌呤的 N-3 甲基化。甲基化嘌呤的糖苷键不稳定，可在中性条件下加热而使甲基化嘌呤脱落，再转为碱性条件下加热，磷酸酯键断开。由此所得的片段经电泳分离后，进行放射自显影而呈现出一组 G 降解产物的深谱线和一组 A 降解产物的浅谱线。如果使用肼，可

使嘧啶肼解，在哌啶存在的条件下，磷酸二酯键会断开。此反应对 C 和 T 都能肼解，然在 2mol/L NaCl 存在的条件下，T 的肼解会被抑制，仅产生 C 肼解的谱线。因此，通过专一修饰物而进行的切断反应能得到同种或两种碱基结尾的片段，即可应用凝胶电泳直接读出核苷酸顺序，可见图 8-29。



化学法(仅示 5′末端)	
切断部位	切断所得的片断(括号内为碱基数)
末切断	^{32}pTACGTAGACT (10)
G 处切断	^{32}pTAC (3)　^{32}pTACGTA (6)
G+A	^{32}pT (1)　^{32}pTAC (3)　^{32}pTACGT (5)　^{32}pTACGTA (6)　^{32}pTACGTAG (7)
C 处切断	^{32}pTA (2)　^{32}pTACGTAGA (8)
C+T	^{32}pTA (2)　^{32}pTACG (4)　^{32}pTACGTAGA (8)　^{32}pTACGTAGAC (9)

图 8-29　化学法测定 DNA 排列顺序示意

近二十年来，DNA 顺序分析的研究迅速地发展，1982 年报道了 λ-DNA 48502bp 的顺序分析成功的消息。

8.8.2　RNA 的核苷酸顺序分析

RNA 中的核苷酸顺序的测定应用了两类方法。

(一)经典片段重叠法

此法类似于蛋白质顺序分析的经典片段重叠法，它应用了两种以上对碱基具有专一性的核糖核酸酶，分别将两份以上的 RNA 水解成各种片段，然后分别测定各份水解产物片段的核苷酸顺序，再使用重叠法判定完整顺序。

(二)直接阅读法

根据 DNA 顺序分析直接阅读法，利用专一性降解产生不同链长的寡核苷酸片段，通过凝胶电泳进行分离和检测；又可利用依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶或反向转录酶合成一系列不同链长的 RNA 片段，再经凝胶电泳分析读出顺序。

8.9 核酸在生物中的功能

核酸是最重要的、最基本的生命组成分子，无论在高等生物、低等生物、甚至最简单的病毒中，核酸决定着生物的性状、生物的遗传与生长、变异与分化、发育与进化。核酸也许是地球上最早出现的生命分子，它还参加其它一些生命过程。

8.9.1 DNA 决定生物的性状

高等、低等生物都以 DNA 为其遗传的物质基础。

通过 DNA 转化实验，例如肺炎球菌有光滑型（S）和粗糙型（R）两种，前者无毒具有荚膜，菌落光滑，从其中可分别提取 DNA、蛋白质和荚膜多糖等物质。如果将提取的这些物质和无荚膜的粗糙型毒性肺炎球菌一起培养，结果表明，仅 DNA 能使粗糙型细菌转变为光滑型。但经水解的 DNA 却没有了这种转化能力。

转导实验也证明，DNA 具有决定遗传的功能，例如让噬菌体（P_{22}）先感染 Leu^+ 沙门氏杆菌，使之与寄主染色体整合，获得部分寄主 DNA 后，再将此感染缺陷型的沙门氏杆菌（Leu^-），结果 Leu^- 会转变为 Leu^+。

上述实验表明，生物的各种性状遗传信息都密码于 DNA 的核苷酸排列顺序之中。由于 DNA 是四种基本的核苷酸组成，按照它们的排列组合规律，可能有 4^n 种多核苷链的排列方式。据估计人卵细胞 DNA 含有约 5×10^9 个核苷酸，即相当于 1×10^5 个基因，将呈现出 DNA 密码性状的多样性。

所谓基因，就是一种特定的核苷酸顺序，它可以通过转录、翻译转变为氨基酸排列顺序，而合成各种不同的蛋白质，这些蛋白质进而

决定生物的新陈代谢，决定生物的性状。概括地说，基因就是决定特定蛋白质，也决定特定DNA的DNA核苷酸序列片段。

生物的特定性状是以DNA半保留复制方式而得到遗传。复制过程是首先将构成DNA双螺旋的两条链彼此解开，并都作为复制的模板，分别合成一条互补的新链而又相互结合。于是，子代形成的DNA与亲代DNA具有完全相同的结构，使生物的性状得以延续与稳定。

为了保证生物遗传性状的稳定，防止外源DNA的干扰，生物在进化过程中还自发地形成了一套限制修饰而消除干扰的系统，例如其中的限制性内切核酸酶能专一地分解外源DNA，而生物自身的DNA中相应的核苷酸则在修饰酶（通常是DNA甲基化酶）的作用下得到了修饰，保证不被限制性内切酶分解。

8.9.2 DNA基因的表达调控与其遗传变异

DNA基因表达系指DNA需要通过复制、转录以及翻译来实现它所决定的各种遗传性状与变异。生物的性状往往随生物的生长发育阶段与生活条件，促使DNA中相应的基因表达有变化而不同。基因的表达受了多种因素的控制，例如DNA在染色质中的状态、组蛋白、非组蛋白等的影响，DNA甲基化等修饰的程度，还有复制、转录、翻译各种水平上的调节与控制。

基因重组是生物界新陈代谢过程中的普遍现象。低等生物通常主要在亲代DNA遗传作用下通过转化、接合、转导等方式进行，高等生物可在亲代DNA指令下通过结合或交换等方式完成。

实际上，基因重组过程往往是不同亲本来源的DNA分子间部分片段以共价连接进行的重新组合，在DNA重组的过程中，DNA链上的基因和基因排列有可能发生改变，从而导致生物遗传性状变异。一般规律是基因重组有可能使生物获得新的性状，并推动着生物进化和发展。遗传性状的变异，不仅可以通过DNA重组，也可以通过其它物理化学以及生物学方法来引起基因突变而实现之。

80年代以来，在研究分子生物学的基础上，发展起来的生物工

程(包括蛋白质和酶工程等)和基因工程,意图按照人类预定的设计,通过酶法在体外完成基因重组和改造,可有效地达到改造生物特性的目的。

基因重组也为癌变机制提供了一种可能的解释,当体内抗癌能力下降(例如限制性内切酶分解外源 DNA 活性降低)时,外源致癌物中 DNA 经酶解成核酸单链,与体内或细胞内复制过程双螺旋解开成单链的 DNA 随机结合,构成变异的致癌 DNA,它的基因在细胞内或体内表达,就导致癌细胞的生长和扩散。亚硝基类物质可引起核酸中某些核苷酸脱氨而变异,促进形成含致癌的 DNA,又是另一种可能的解释。不过,基因重组的变异效应也可能被人类利用于改良品种,现在发展起来的基因工程已对人类作出了有益的贡献。

8.9.3 RNA 在生物中的功能

(一)RNA 病毒的遗传机制

现已发现,部分病毒的核酸只是 RNA,对于这类称为 RNA 病毒的生物来说,发挥遗传功能的只能是 RNA,例如,从仅含 RNA 的烟草花叶病毒的诱变实验得到了证明。如果用亚硝基胍处理它的 RNA,引起其中某些核苷酸碱基脱氨,然后用它再感染烟草,就会形成新的病毒,其外周蛋白质的某些氨基酸残基也随着发生变化而变异。此外,还发现在 RNA 的复制中,有的是从 RNA 直接合成新的 RNA,也有的是通过反向转录酶先合成 DNA,然后再合成 RNA。

(二)RNA 对蛋白质生物合成起关键作用

通常,DNA 先通过转录将自己的遗传信息转变为 mRNA 的核苷酸顺序,再通过翻译成为蛋白质的氨基酸顺序,以合成相应的蛋白质,在翻译过程中还需要其它 RNA 与蛋白质因子参加,而 mRNA 决定合成的蛋白质所具有的结构和性质方面起着关键性的作用。

(三)RNA 呈现某些催化功能

tRNA 前体的加工剪接需要多种酶的作用,其中有一种 tRNA 前体加工酶 RNase P,它是专一性催化 tRNA 前体 5′-端加工的酶。这种酶含有 1/4 的蛋白质和 3/4 的 RNA。它不能被胰蛋白酶消化,

但在微球菌核酶或 RNaseA 作用下失活。如果用层析电泳法将 RNaseP 所含的蛋白质和 RNA 分开成两个单独组分，它们分别在 10mmol/L Mg^{2+} 存在的条件下都不表现出 RNase P 的活性，若将这两组分重新组合在一起，RNase P 的活性又会恢复。此外，还发现在大于 20mmol/L Mg^{2+} 或者 10mmol/L Mg^{2+} 和 1mmol/L 亚精胺存在的条件下，单独的 RNA 组分也具有加工 tRNA 5'-端的活性，而单独蛋白质组分就没有这样的活性。在 1,4-α-糖元支链酶、磷酸果糖激酶等实验中也观察到类似的情况。

从一种鞭毛原生动物四膜虫的研究发现，它的 26S rRNA 内基因中有一段内含子(intron)，可使转录的直接产物中含有一段插入顺序(IVS)。倘若除去 IVS 段，让 5'-端外显子(exon)和 3'-端外显于相互连接能转变为成熟的 26S rRNA，这表明四膜虫 26S rRNA 前体的自我剪接是四膜虫内 RNA 呈现的一种功能。此类剪接加工过程可在离体条件下进行，过程只需要 Mg^{2+}，鸟苷或 5'-鸟苷酸参与，并不需要蛋白质介入。可以认为，这是一种自我催化完成的过程。综上所述，人们判定 RNA 具有某些催化功能，而 IVS 在此催化过程中起着活化外显子的不可缺少的作用。

IVS 还能自身环化，继而先后去掉 15 个和 4 个核苷酸而成为共除去 19 个核苷酸的线性 IVS(简记为 L-19-IVS)。Cech 等将这种具有催化自我剪接能力的 IVS-RNA 命名为 ribozyme，以和蛋白质性质类的催化剂(酶，enzyme)相区别。L-19-IVS 也能催化其它 RNA 分子的水解和连接反应，例如，它在寡聚 C 为底物时有催化核苷酸转移聚合的活性，也有磷酸二酯酶的活性。它还有 RNA 限制性内切酶活力。

mRNA 中 IVS 也有类似的催化自我剪接的能力，不过，它仅需要 Mg^{2+}，无需鸟苷类的衍生物，所形成的 IVS 是套环结构(见图 8-30)。

RNA 具有催化转移聚合的自我复制活性的发现，改变了过去认为只有蛋白质的酶才具有催化功能的传统观念。

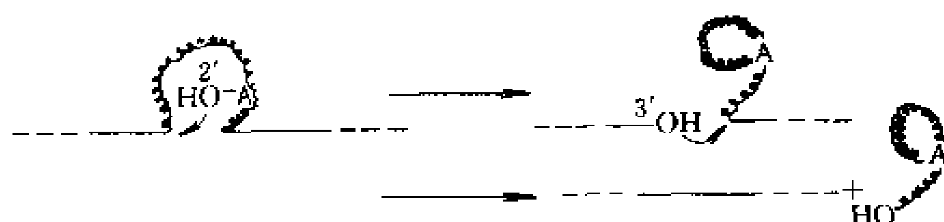


图8-30　mRNA前体中IVS的自我催化加工机制

(四)RNA在基因表达中的调控作用

过去认为,在原核生物和真核细胞中,基因的表达都是通过调节基因密码合成的蛋白质来进行调节控制的。然而,某些调节基因产生的RNA也具有调控基因表达的作用,这类调节基因称为反义基因,它的表达产物RNA称为反义RNA。

反义RNA的特点是在它的结构上碱基排列与相应的mRNA(即受它调控的mRNA)的碱基排列可形成互补碱基对,正由于如此,反义RNA能影响mRNA的翻译,并控制相应基因的表达。基于同样的原因,反义RNA对基因的表达呈现非常专一性的调控。

据报道,已发现在细菌中有反义RNA存在,而真核生物中仅在酵母内发现肌动蛋白质mRNA的反义RNA。不过,很多真核细胞的RNA表现出反义RNA的功能,如鸡胚细胞中有一类富含U的小分子RNA具有控制翻译的作用,被称为翻译控制RNA(tcRNA)。反义RNA的发现,可能为防治肿瘤、病毒致病以及先天性遗传疾病的研究开辟了一条途径,即研究的设想课题是设法引入人工合成的反义基因或反义RNA,以控制细胞内的肿瘤基因、病毒基因或其它有害基因在体内的表达。例如,应用反义RNA抑制疱疹病毒的胸核激酶(HSV-TK)基因在小鼠LTK^-细胞中的表达获得了成功。现报道,已有约20多种真核基因,可应用人工合成的反义基因或反义RNA,都能不同程度地控制它们在体内的表达。

反义RNA的发现,为癌变机制提供了又一种可能的解释,假定细胞内已存在一种肿瘤基因c-myc,它的转录产物mRNA有三段外显子,第二段外显子中包含第一个起始密码子AUG;第一段虽无密

码蛋白质,但可和第二段外显子的部分序列形成互补的双链茎环结构,影响着该 mRNA 起始密码子附近的二、三级结构,因而在正常生理条件下,不能翻译,即肿瘤不能表达,但在某种例如促使基因移位情况下,便会引起这种 mRNA 失去了第一段外显子,改变了第二段外显子的二级结构,暴露出活性部分,致使其起始密码子 AUG 易于和核糖体结合并翻译出相应的蛋白质,肿瘤基因便得到了表达而有可能导致癌变。

8.10 核酸的人工合成

随着分子生物学研究的不断深入,对基因工程和蛋白质工程的探索不断开展,吸引着科技人员迫切需要去探讨核酸的结构与其功能的关系,也激励着人工合成生命大分子——蛋白质和核酸的研究,现在这些内容已成了方兴未艾的前沿课题。

核酸人工合成的研究进展很快,1955 年成功地合成了 T_pT 和 $_pT_pT$,1977 年完成了生长激素释放抑制因子基因的合成与表达,1981 年又成功地全合成酵母丙氨酸 tRNA。至今,核酸的人工合成方法大概有两种,即化学合成和酶促合成。

8.10.1 核酸的化学合成

(一)核苷酸官能基团的保护与保护基团解脱

核苷酸是一个多官能基团的化合物,在化学合成过程中容易发生错接或自聚等副反应,所以为了避免这类副反应,必须和肽合成那样,先将相应核苷酸上不应该参加反应的基团,暂时用保护基遮盖办法将其保护起来,然后进行缩合连接反应。一轮缩合反应完成后,必须将缩合了的核苷酸上的相应保护基解脱。同时将待连接的核苷酸上相应不该连接的基团保护起来,尔后再进行缩合连接反应,保护——缩合连接——解脱一轮又一轮如此地反复,直至合成完成。

在核苷酸中需要保护的基团包括羟基、氨基和磷酸基,常用的保护基及其解脱条件分别列于表 8-6、表 8-7 和表 8-8。保护基应按以

下原则选择:(1)易于引入并容易解脱;(2)有较高的反应专一性,且相互间不干扰引入和解脱;(3)保护基引入后不影响应该连接处的缩合反应,例如不产生空间位阻或影响连接活性等;(4)在引入和解脱保护基时不引起核苷酸残基的破坏和多核苷酸链的断裂和改变。

表 8-6 常用的羟基保护基

基 结 构	基缩写	保护位置	解脱条件
CH_3O—(C₆H₄)—C(C₆H₅)₂— Mmt-Cl	Mmt-	5′-OH	80% HAC;1% TEA 的乙醇溶液;2% 苯磺酸的 $CHCl_3$-CH_3OH(7:3)溶液;$ZnBr_2$/CH_3NO_2;$(C_2H_5)_2AlCl$ 或 $(iBu)_2AlCl$。
CH_3O—(C₆H₄)—C(C₆H₅)(C₆H₄OCH_3)— Dmt-Cl	Dmt-	5′-OH	同 Mmt
$CH_3COCH_2CH_2CO$—乙酰丙酸/DCC	Lev-	5′-OH	肼
C_6H_5—C(=O)— 苯甲酰氯	Bz-	2′-OH;3′-OH	OH^-或氨解
CH_3—C(=O)— 乙酰酐	Ac-	2′-OH;3′-OH	OH′或氨解

续表

基　结　构	基缩写	保护位置	解脱条件
$CH_3-CH(CH_3)-C(=O)-$ 异丁酰氯	iBu-	G 的 2′-OH 和 3′-OH	OH^-或氨解
$C_6H_4(NO_2)-CH_2-$	Nb-	2′-OH	光解
(O 环)	Thp-	2′-OH 3′-OH 或 5′-OH	0.01mol/L HCl
OCH_3 (O 环)	Mthp-	同 Thp-	同 Thp-，但比 Thp-更易酸解
$CH_3-C(CH_3)_2-Si(CH_3)_2-$	Dmtbs-	2′-OH	$(C_2H_5)_4NF$

TEA 为三乙胺；DCC 为二环己基碳二亚胺。

表 8-7　常用的氨基保护基

基　结　构	基缩写	保护位置	解脱条件
$C_6H_5-C(=O)-$ 苯甲酸酐	Bz	A 和 C	氨解
$CH_3O-C_6H_4-C(=O)-$ 对甲氧苯甲酰氯	An	C	氨解

续表

基 结 构	基缩写	保护位置	解脱条件
$CH_3CH(CH_3)-C(=O)-$ 异丁酰氯	iBu	G	氨解

表 8-8 磷酸保护基

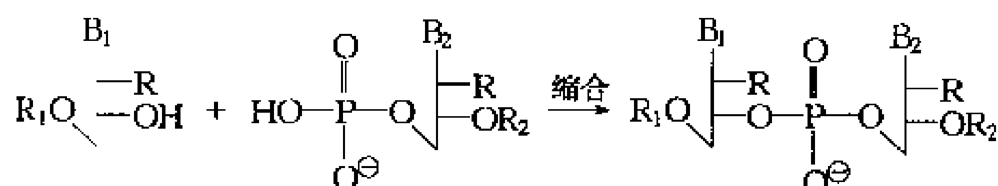
基结构	基缩写	保护位置	解脱条件
$-CH_2CH_2CN$	-Ce	末端磷酸	OH^-,氨解 或三乙胺/吡啶(三酯时)
$-CH_2CCl_3$	-Tce	末端磷酸	Zn 还原
—NH—(苯基)	-NHϕ	末端磷酸	亚硝酸异戊酯
—(对氯苯基)—Cl	-PcP	核苷间的磷酸	氨解,2-硝基苯甲醛肟(或2-吡啶甲醛肟)的四甲基胍盐,氟化四丁铵
—(邻氯苯基),Cl	-Ocp	核苷间的磷酸	同上
$-CH_3$	-Me	核苷间的磷酸(用于亚磷酸酯法)	硫代苯酚三乙胺

(二)缩合连接反应

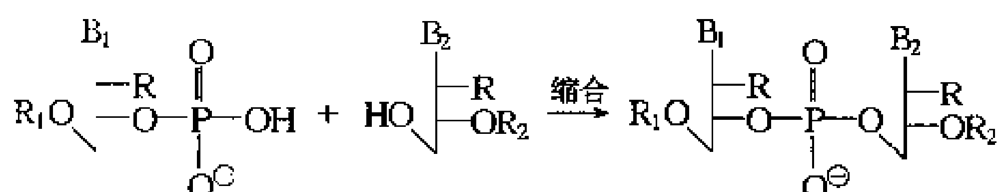
核酸的合成是保护了的核苷酸按照特定排列顺序的要求进行缩合反应,让它们以3′、5′磷酸二酯键连接,缩合过程的路线可概括为三种类型。

(1)磷酸二酯法:此法是通过核苷酸磷酸单酯和羟基的缩合反应,生成3′、5′磷酸二酯键。常用的缩合剂为二环己基二亚胺(dicyclohexylcarbodiimide,DCC)和2,4,6-三异丙基苯磺酰氯(triisopropy-

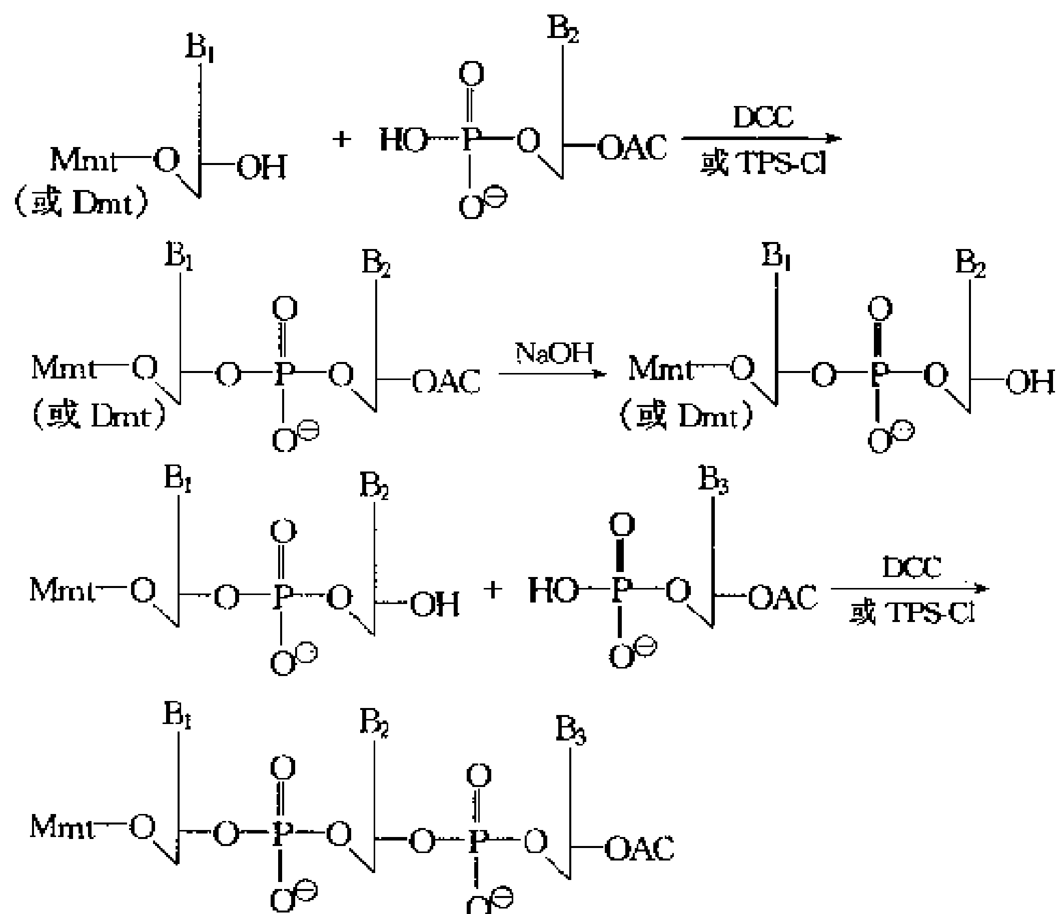
lioenesulfonic chloride,TPS-Cl)。对于 DNA,易得 5′-单核苷酸,因此常用下述的一种连接方式:



对于 RNA,易得到 3′-单核苷酸,所以常用另一种连接方式如下:



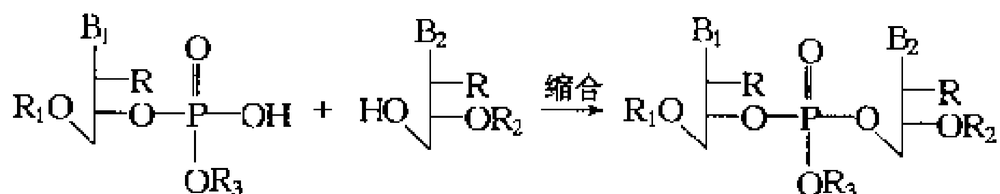
例如脱氧三核苷二磷酸的合成过程:



此法由于核苷间磷酸上尚有一未保护的羟基,可以发生副反应,使按特定要求的缩合产率下降,且副产物干扰了产物分析。此外,磷

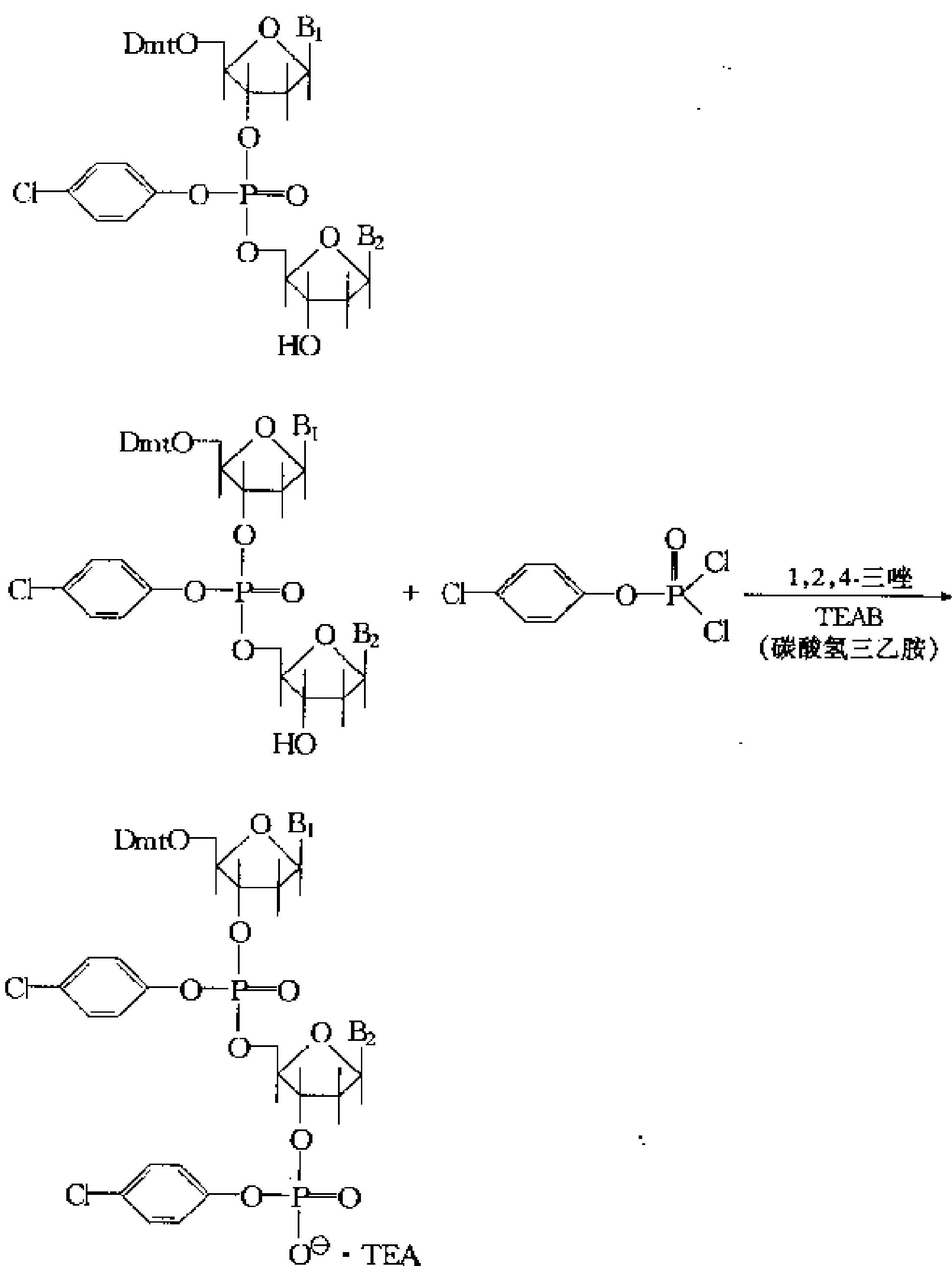
酸二酯法不适宜固相合成，实现自动化技措困难。

(2)磷酸三酯法：这是一种以磷酸二酯和羟基缩合生成磷酸三酯来完成核苷酸连接的方法。



该法使用了高效的活化缩合剂，如 2，4，6-三异丙基苯磺酰四唑(TPSTE)等。磷酸三酯法是在磷酸二酯法保留羟基和氨基的保护方法的基础上，采用了邻(或对)氨苯基衍生物保护磷酸，使副反应较少，而生成的磷酸三酯衍生物较稳定，用浓氨水等处理下才容易解脱。

以脱氧二核苷二磷酸三酯衍生物的合成为例：



该法反应速度快，副反应少，产率高，产物易分离，并可进行固相合成。

固相合成法容易除去未反应物和副反应产物，每次连接产物的

分离纯化手续可简化，易于实现合成的自动化。

固相合成的技措是先将核苷酸链的一末端（例如 3′端核苷酸）先固定在不溶性高分子载体上，然后再从另一末端核苷（例如 5′端）或核苷酸开始逐个延长核苷酸链（简介示于图 8-31）。

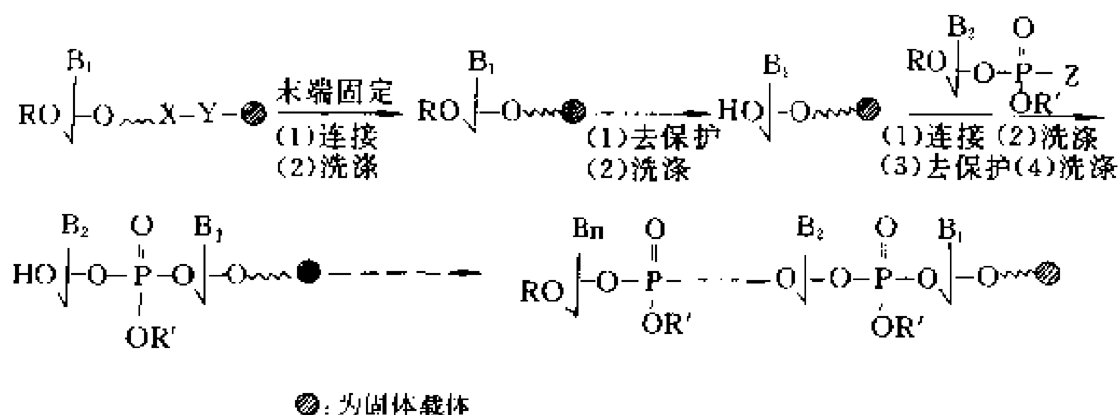
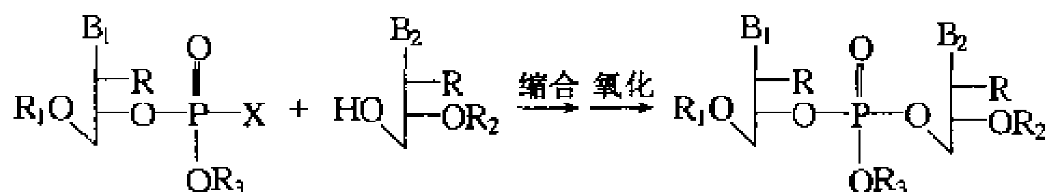


图 8-31　核酸固相合成示意

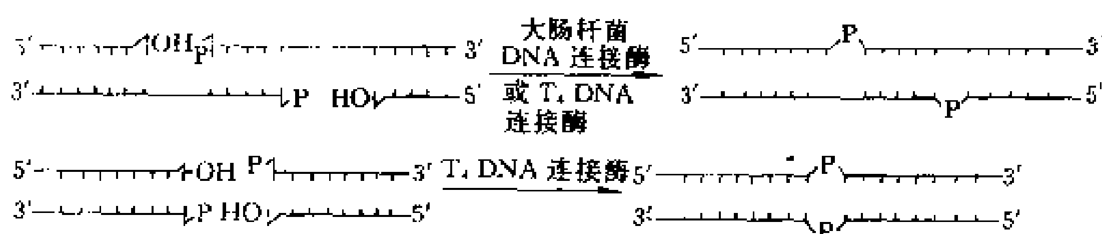
（3）亚磷酸三酯法：这是使用亚磷酸二酯和羟基进行缩合反应生成亚磷酸三酯的方法。



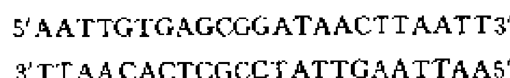
此法也可采用固相合成体系，不过试剂的制备较麻烦。

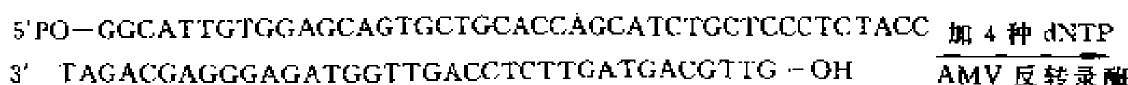
8.10.2　核酸的酶促合成

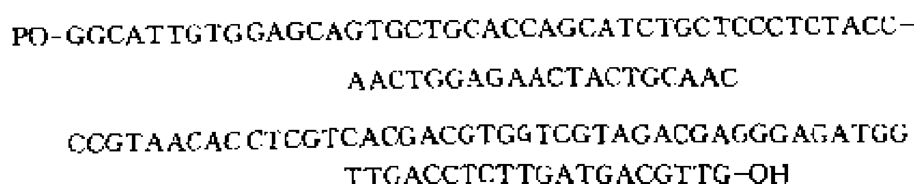
DNA 连接酶反应、DNA 聚合酶 Klenow 片段催化的聚合反应和反向转录酶反应，是在 DNA 合成中常用的酶促反应，例如以下这些酶促反应过程





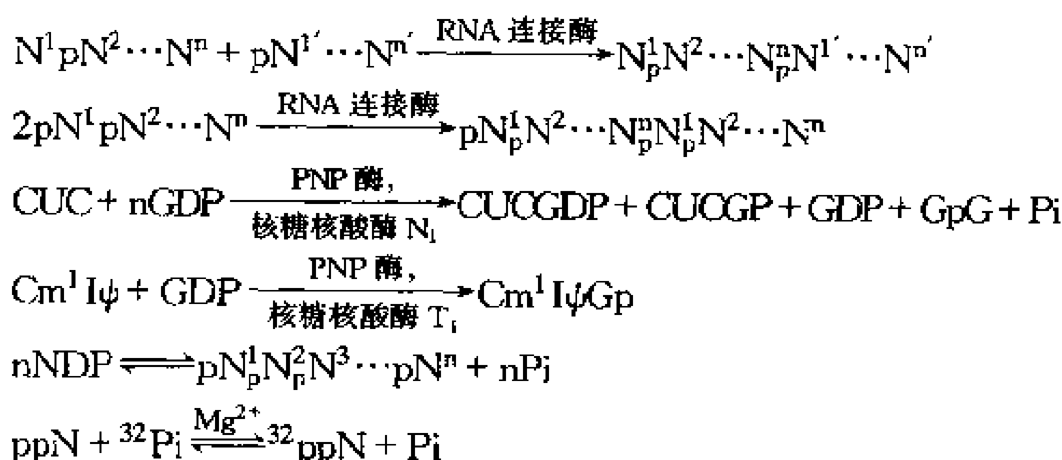






酶促合成有许多优点，它的反应条件温和，效率高，反应专一，副反应少，产率好，不需要进行太复杂的保护与保护基解脱技措，不仅能合成小片段，还能合成大片段。一般常先应用化学方法合成小的寡核苷酸片段，然后再进行酶促反应使它们连接成大片段。

RNA 合成中主要应用 T_4RNA 连接酶进行酶促反应，还应用多核苷酸磷酸化酶(PNP)反应和核糖核酸酶 T_1、N_1 等逆相合成反应。示例如下：



$$N^1pN^2\cdots N^n + pN^{1'}\cdots N^{n'} \xrightarrow{\text{RNA 连接酶}} N^1_pN^2\cdots N^n_pN^{1'}\cdots N^{n'}$$

$$2pN^1pN^2\cdots N^n \xrightarrow{\text{RNA 连接酶}} pN^1_pN^2\cdots N^n_pN^1_pN^2\cdots N^n$$

$$CUC + nGDP \xrightarrow[\text{核糖核酸酶 } N_1]{\text{PNP 酶,}} CUCGDP + CUCGP + GDP + GpG + Pi$$

$$Cm^1I\psi + GDP \xrightarrow[\text{核糖核酸酶 } T_1]{\text{PNP 酶,}} Cm^1I\psi Gp$$

$$nNDP \rightleftharpoons pN^1_pN^2_pN^3\cdots pN^n + nPi$$

$$ppN + {}^{32}Pi \overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons} {}^{32}ppN + Pi$$

8.10.3 核酸人工合成的应用

核酸人工合成是深入研究分子生物学、基因工程和蛋白质工程的一种重要手段,并在应用方面取得了一定的进展。

(一)基因合成方面的应用

最早基因合成成功的例子有生长激素释放抑制因子基因的合成与表达,还有人进行了α-干扰素基因的全合成和人生长激素基因的半合成等,并在合成改造的基因及其连接工程的研究中也发挥着重要作用。

(二)引物的合成

引物是合成DNA链的重要核苷酸片段,它在合成cDNA、mRNA中起着重要作用,还应用于蛋白质工程,在合成寡聚核苷酸引物指导定向突变的研究中亦起着重要作用。图8-32示出引物在定向突变和合成DNA新链中的作用。

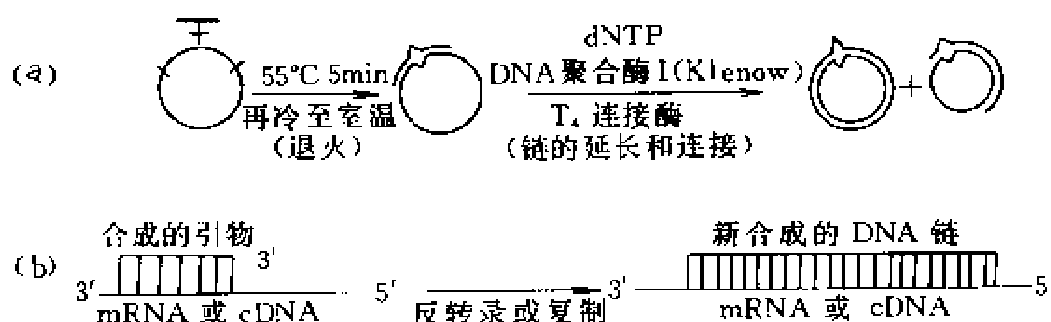


图8-32

引物在(a)定向突变中的作用;(b)合成DNA新链中的作用

(三)探针的合成

人工合成探针以便成为检测所需的基因片段和特定核苷酸片段的有效工具,探针通常都采用人工合成带^{32}P同位素等放射性标记的核苷酸片段。

(四)接头的合成

制备适合于不同需要的载体上构建的多切点接头(包括平头接头和粘性接头),或者做成含有10~12核苷酸的接头用于调整读码

框架。

(五)底物的合成

提供研究限制性内切核酸酶所需要的底物,见图 8-33 所列举的几种限制性内切酶研究用的底物。

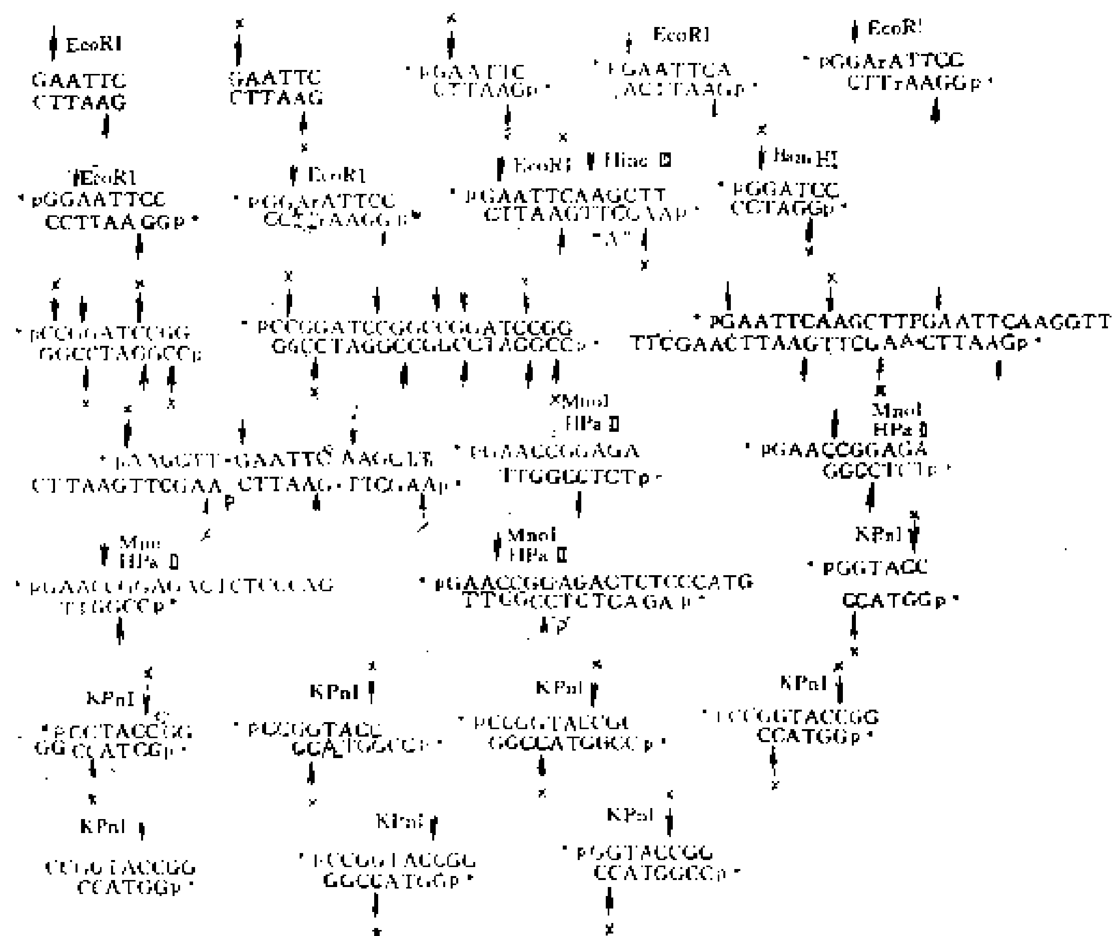


图 8-33　几种限制内切酶的底物

人工合成核酸或核苷酸片段进一步证实了核酸的组成和结构:核酸大分子是由基本单位——核苷酸以 3′-5′磷酸二酯键连接而成,每连接一个核苷酸可能要由一个核苷三磷酸在酶催化下提供核苷酸及能量。但据估计每个磷酸酯键蕴藏着标准自由能约 60 千焦耳左右。由此可见,核酸大分子还是一个巨大自由能贮存库,它可能与生命活动中的能量转换也有着密切的关系。

结　束　语

由上可知,核酸的结构与机体中的新陈代谢和遗传进化机制紧密相关。因此,应用物理化学方法对核酸的结构、功能及其表达的关系进行研究,显然是生物分子学的前沿高科技的研究课题。在这领域中的探索成果将对工农业生产作出有益的贡献,例如对品种的改良,提高品种的质量或产量等都将起着积极的作用,甚至对农业的绿色革命也会起着推动作用。不过,务必注意,如果对这些成果和手段使用不当,将会给人类带来灾难。

第九章　核酸和蛋白质的代谢与物质代谢的相关联系及调控

所有生物都在不断地进行着生命物质核酸和蛋白质的代谢，它们的复制合成是最重要最基本的代谢，正由于它们能复制合成，生物的遗传性状才能延续，生命活动才得以保证，其它物质的代谢才可能进行。

9.1　氨基酸的供应

9.1.1　氨基酸的来源

蛋白质是由各种氨基酸构成的，据分析这类氨基酸大约有20种，对人和高等动物来说，其中约10种可由机体自己合成而满足供应自身需要，此类氨基酸被称为非必需氨基酸。它们是丙氨酸(Ala,A)、半胱氨酸(Cys,C)、酪氨酸(Tyr,Y)、谷氨酸(Glu,E)、天冬氨酸(Asp,D)、丝氨酸(Ser,S)、谷氨酰胺(Gln,Q)、天冬酰胺(Asn,N)、甘氨酸(Gly,G)、脯氨酸(Pro,P)。其它的氨基酸是机体内不能自己合成的，或虽能合成却不能满足机体中物质代谢的需要，还必须从外界摄取，它们被称为必需氨基酸，也有10种左右，即赖氨酸(Lys,K)、色氨酸(Trp,W)、苯丙氨酸(Phe,F)、缬氨酸(Val,V)、甲硫氨酸(Met,M)、亮氨酸(Len,L)、苏氨酸(The,T)、异亮氨酸(Ile,I)、精氨酸(Arg,R)和组氨酸(His,H)。后二种在机体内合成速度很慢，不能满足需要。不过，对于植物和微生物来说，这些氨基酸可从糖代谢的中间产物转化合成而获得。所以，人类必须注重从植物等蛋白质中摄取必需的氨基酸，偏食将带来严重的后果。

氨基酸的来源概括为以下途径:从消化食物蛋白质中摄取;由体内细胞蛋白质成分的降解获得。此外,高等动物的非必需氨基酸可通过自身内生物合成途径获得。

(一)食物蛋白质的消化与氨基酸吸收

高等动物的胃肠道中含有多种蛋白酶与肽酶,能将食物蛋白质彻底水解为氨基酸,例如胃粘膜分泌胃蛋白酶和胰腺分泌胰凝乳蛋白酶以及弹性蛋白酶可将蛋白质分解成肽段,又经胰腺的羧基肽酶A降解为芳香族或脂肪族的中性氨基酸和寡肽;胰腺分泌的胰蛋白酶和羧基肽酶B相继消化蛋白质产生碱性氨基酸;肽段能在小肠粘膜分泌的氨基肽酶和二肽酶催化下水解成氨基酸。然后由小肠粘膜吸收。胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶等是属肽链内切酶,它们能水解肽链内部的肽键。羧肽酶和氨肽酶等是属肽链外切酶,它们只水解肽链两端氨基酸所形成的肽键。二肽酶只水解二肽。所以食物蛋白质在动物消化道中,是经一系列酶的联合作用才会被水解成氨基酸。

由于蛋白酶具有专一性水解肽键的作用,苯丙氨酸、酪氨酸等氨基和其它氨基酸所形成的肽键,胃蛋白酶能催化其迅速水解,而对亮氨酸与酸性氨基酸等所形成的肽键水解较缓慢。胰蛋白酶能水解由碱性氨基酸的羧基所形成的肽键。胰凝乳蛋白酶水解由芳香族氨基酸的羧基所形成之肽键。

刚分泌出来的胃蛋白酶原要经胃酸(HCl)激活,胰蛋白酶原是由肠激酶激活,胰凝乳蛋白酶可由胰蛋白酶激活。这些蛋白酶在细胞内以酶原形式存在,是能保护组织细胞不被这些蛋白酶水解作用所破坏。如果胰蛋白酶原在胰腺内被激活,会引起急性胰腺炎而疼痛。

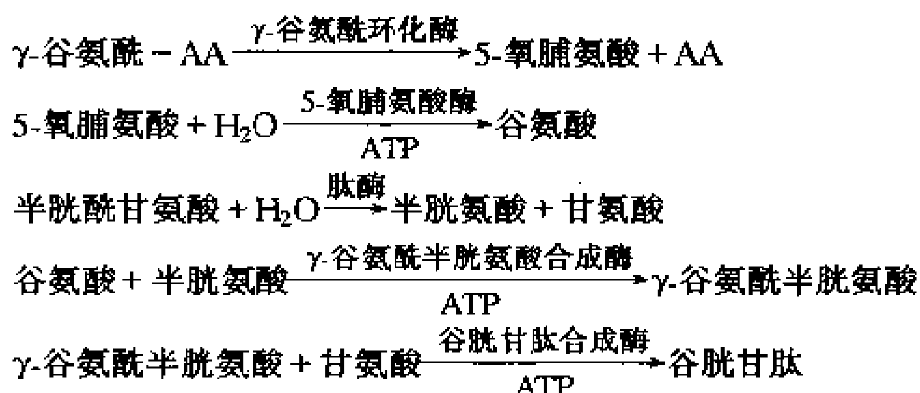
关于氨基酸的吸收可能有两种机制:

(1)通过钠泵作用进行主动输送,因为肠粘膜处细胞膜上存在着氨基酸的输送载体,它们能在膜外侧和相应的氨基酸与钠离子结合形成三元络合物,将氨基酸和钠离子输送至细胞内,然后钠泵再将钠

离子排出膜外。膜上可能有四种输送载体，即有输送脂肪族氨基酸、芳香族氨基酸、含硫氨基酸及组氨酸等中性氨基酸的；输送酸性氨基酸的；输送碱性氨基酸的；以及输送亚氨基酸和甘氨酸的载体。这四种载体的输送速度随上述次序递减。

(2)在γ-谷氨酰转肽酶的作用下吸收，其机理概括于下：

谷胱甘肽(食物蛋白消化生成的片段)+AA(某一种氨基酸) $\xrightarrow{\gamma\text{-谷氨酰转肽酶}}$ γ-谷氨酰-AA+半胱酰甘氨酸，它们能穿过膜而被吸收，γ-谷氨酰-AA在环化酶作用下释放出氨基酸(AA)，最后再在其它酶作用下再生谷胱甘肽，此过程如下：



(二)体内细胞蛋白质成分的降解

体内任何一种蛋白质分子都要经历降解和更新，它们在酶作用下不断地被分解，又不断地合成，进行着更新代谢。根据体内细胞蛋白质成分降解速度是服从一级反应动力学规律，于是，通常可用降解50%所需要的时间——即"半寿期"来表达，各种蛋白质的"半寿期"很不相同。关于降解的蛋白质可归纳为两类，一类是异常的、部分变性的蛋白质；另一类是正常蛋白质。

关于异常的、部分变性的蛋白质，它们或者由于合成过程的误接，导致畸变，或者由于外源病毒等蛋白质参与合成过程而病变，或者由于化学修饰而变异，或者由于过氧化物自由基造成的损伤。它们均或多或少地不同于体内正常蛋白质的构象，体内各种蛋白酶就会敏感地对它们进行降解作用。在正常发育条件下，生物体内具有如合成修正机构，过氧歧化酶等各种机构来防止异常蛋白质分子的

产生，一旦异常分子逃脱这类防止机构的控制而出现时，机体也会分泌各种酶对它进行迅速水解而消除或排泄，避免它们的积累而将有害因子尽可能地排除掉。这是机体具有的一种自然保护措施。

对于正常蛋白质的分解和合成是属于正常代谢过程，在机体成长过程中，蛋白质的合成复制要多于降解。正常蛋白质的“半寿期”长短往往和它们的构象有关。酸性蛋白质比碱性蛋白质较易水解。氨基酸分解、RNA 合成和胆固醇转化等系统中那些在代谢途径中，起着制约速度作用的关键酶，它们的“半寿期”平均不过 2h，然而在细胞内的水平通常因日夜周期、营养条件、生理状态等的变化而有显著改变。例如起着氨基酸降解酶作用的色氨酸氧合酶，其“半寿期”在色氨酸及相关辅助因子存在时会明显地延长。谷氨酰胺合成酶在谷氨酰胺大量积累时，其降解速率会迅速上升。

现已提出有两种类型降解蛋白质的机制：一种是溶酶体系统的作用和另一种 ATP 参与的蛋白质水解系统的作用。

(1)溶酶体系统

溶酶体系统主要存在于真核生物中，它是集中了细胞内水解酶的细胞器，能发挥胞饮、吞噬外源物质的作用，也能吞噬细胞自体内待降解物，然后对“半寿期”长的蛋白质、膜蛋白和外源蛋白质等进行降解。相当于胃蛋白酶的组织蛋白酶 D、与木瓜蛋白酶相似的巯基组织蛋白酶 B、H 和 C，外切组织蛋白酶 A 等都参与了对蛋白质的降解。溶酶体对蛋白质的降解除了受温度、营养条件、生理状态及激素的调控外，也由抑蛋白酶醛肽(leupetin)等抑制。

(2)需 ATP 参与的蛋白质水解系统

该系统存在于真核生物的网织红细胞、线粒体及大肠杆菌中。这种系统是在偏碱性条件下，有 ATP 参与时才呈现出降解异常蛋白和“半寿期”短的正常蛋白等的作用。其中 ATP 的内切酶在 ATP 存在情况下，能识别待降解蛋白，并将它们降解成大肽段。然后由不必 ATP 参与的内切酶将大肽段分解成小肽，最后被肽酶(hexopeptidase)降解为氨基酸。

ATP 的内切酶在大肠杆菌中至少有 7 种，其中蛋白酶 La 研究得较清楚，网织红细胞中有 3 种，相对分子质量都很大($4.5\times10^5\sim5\times10^5$)。对于需 ATP 参与的蛋白质水解系统的识别机制尚未研究清楚。现已发现一种广泛存在于各种生物中，被称为“uniquitin”的耐热性小肽，它可能参与作用。它能被 ATP 活化，并借助其活化的羧基专一性地与异常蛋白的赖氨酸残基缩合，而标记该蛋白，然后经内切蛋白酶识别降解。

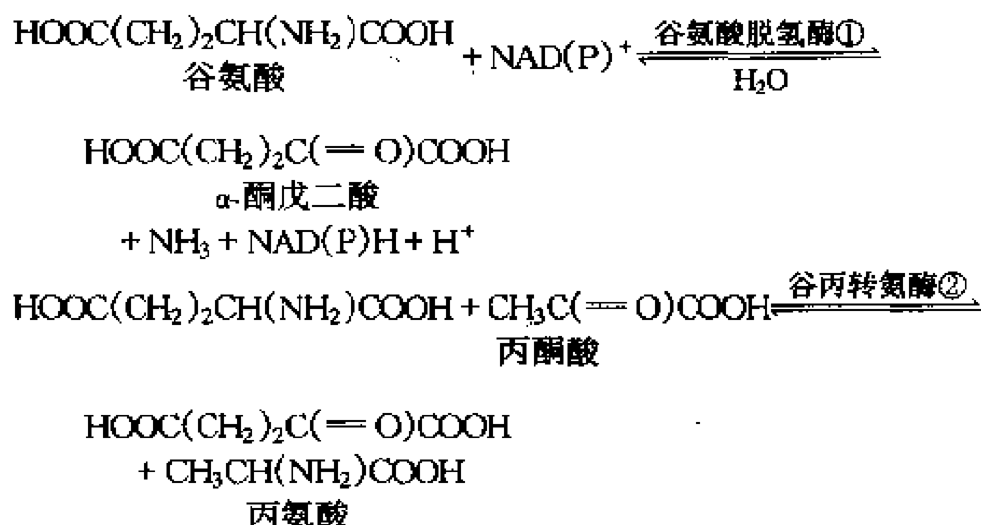
体内细胞蛋白质成分降解的重要意义是防止异常蛋白的存在，消除老化失活蛋白，供应代谢的碳氮物质再利用，维持氨基酸的储蓄平衡，并根据环境条件变化与生理机能需要及时调节酶的水平。

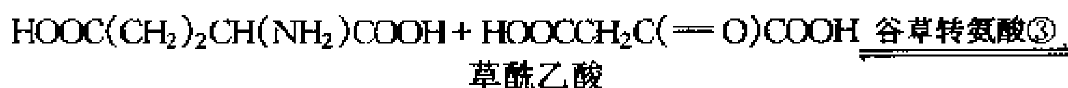
9.1.2　非必需氨基酸的合成

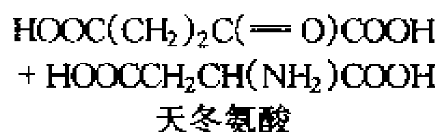
几乎所有生物都能自身生物合成这类非必需氨基酸。原料来自糖代谢的中间产物，或某些其它氨基酸，利用这些物质作前体时的合成路线较为简单，大概有 4 种体系。

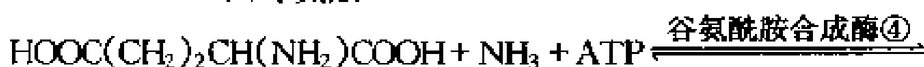
(一)谷氨酸转变成 α-酮戊二酸为前体的合成体系

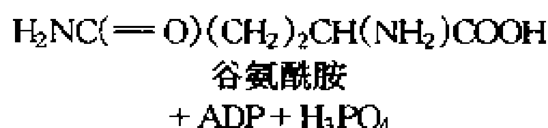
在此合成体系中参与的物质还有三羧酸循环中的草酰乙酸和醇解循环中的丙酮酸，合成的产物是谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺、丙氨酸和脯氨酸等。现举例如下：



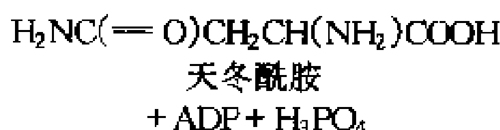








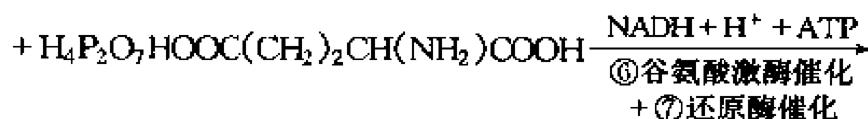


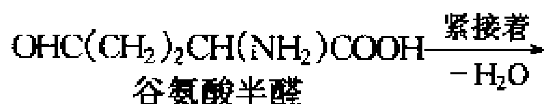


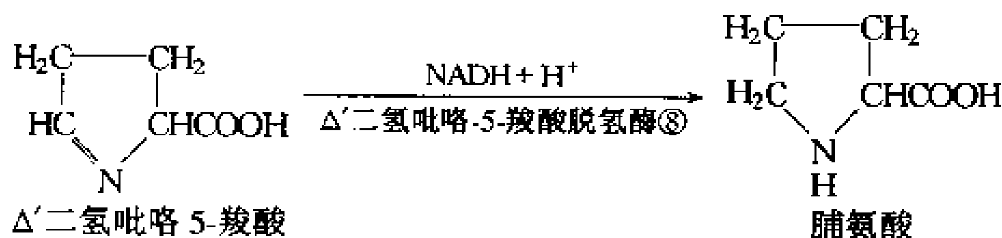








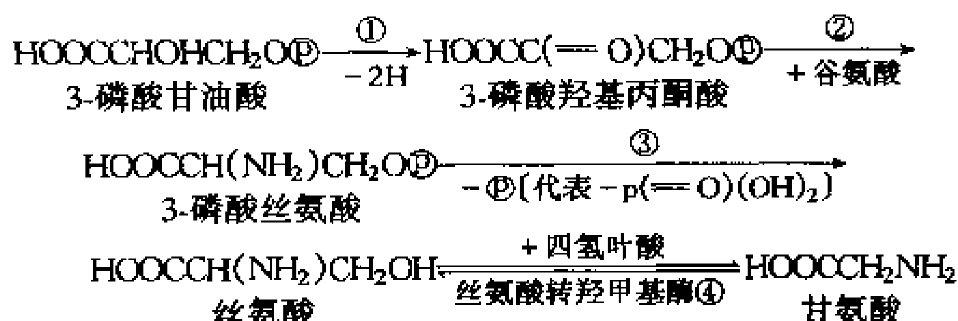




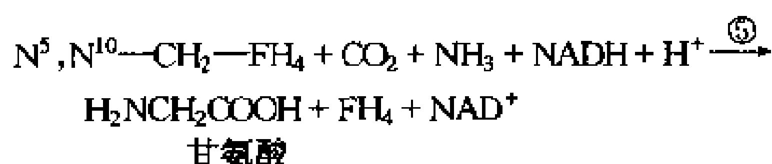
(二)丝氨酸和甘氨酸合成途径

以糖醇解中间产物3'-磷酸甘油酸为前体,经①磷酸甘油酸脱氢酶、②磷酸丝氨酸转氨酶和③磷酸丝氨酸磷酸酯酶等三种酶相继催

化而生成丝氨酸。丝氨酸由丝氨酸转羟甲基酶④催化又可形成甘氨酸。生物合成过程如下：

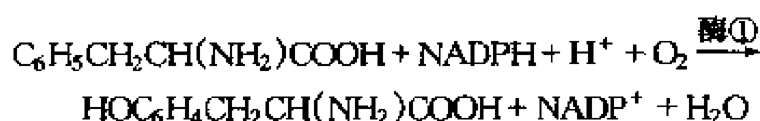


在丝氨酸转化为甘氨酸的过程中，参加的四氢叶酸(FH_4)在反应脱水后形成N^5,N^{10}-甲叉FH_4(即$N^5,N^{10}—CH_2—FH_4$)，这化合物在脊椎动物肝脏中能由甘氨酸合成酶⑤催化合成甘氨酸，即



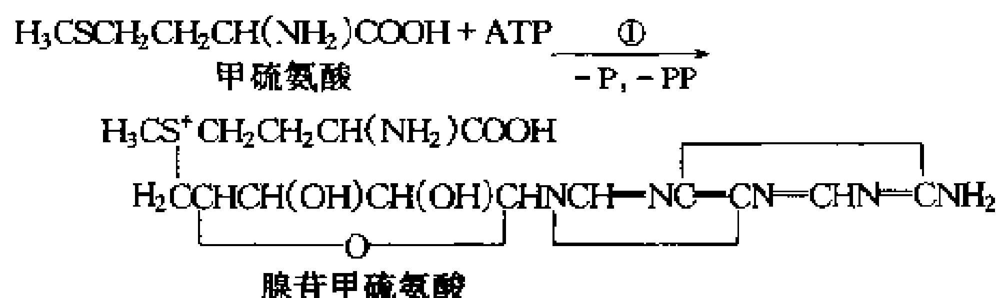
(三)酪氨酸的生物合成

此生物合成途径是由苯丙氨酸-4-单加氧酶①催化苯丙氨酸转化而生成酪氨酸，该反应也需要尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)和氧参加。



(四)半胱氨酸的生成

这是以甲硫氨酸(蛋氨酸)为原料，经①甲硫氨酸转腺苷酶、②转甲基酶、③胱硫醚-β-合酶和④胱硫醚-γ-解酶等四种酶的相继催化，而合成半胱氨酸的途径。



$$\xrightarrow[-CH_3]{②} \underset{\text{腺苷同型半胱氨酸}}{\text{H}_2\text{CCHCH(OH)CH(OH)CHNCH=NC=CN=CHN=CNH}_2 \text{ (S连 SCH}_2\text{CH}_2\text{CH(NH}_2\text{)COOH)}} \longrightarrow$$

$$\underset{\text{同型半胱氨酸}}{HSCH_2CH_2CH(NH_2)COOH} \xrightarrow{③} \underset{\text{L-胱硫醚}}{HOOCH(NH_2)CH_2SCH_2CH_2CH(NH_2)COOH}$$

$$\xrightarrow[+H_2O]{④} \underset{\text{半胱氨酸}}{HSCH_2CH(NH_2)COOH} + CH_3CH_2C(=O)COOH + NH_3$$

上述反应过程的中间产物胱硫醚在人脑中含量需很高，如缺乏胱硫醚-β-合酶的遗传病患者会表现为高胱氨酸尿症，智力发育不全。

此外，微生物可从丝氨酸出发，由半胱氨酸合成酶⑤催化，能得到半胱氨酸。

$$L—HOCH_2CH(NH_2)COOH + H_2S \xrightarrow{⑤} L—HSCH_2CH(NH_2)COOH + H_2O$$

9.1.3 必需氨基酸的生物合成

通过植物和微生物的生物合成必需氨基酸以供应人类和动物的需求，虽然它们也都是以糖代谢的中间产物为前体，但它们的合成途径相对地较为复杂。

(一)天冬氨酸为前体的合成路线

以天冬氨酸起始可合成赖氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸和异亮氨酸等四种氨基酸，现分别叙述如下：

(1)合成赖氨酸需要 8 种酶相继地催化进行反应后方能完成。首先，天冬氨酸在天冬氨酸激酶催化，ATP 参与反应变成 ADP，从而提供能量和转移磷酸基团条件下，形成了 β-天冬氨酸磷酸〔$HOOCCH(NH_2)CH_2C(=O)OPO_3H_2$〕，随后经天冬氨酸半醛脱氢酶催化，$NADPH + H^+$ 参与反应变为 $NADP^+ + Pi$ 情况下，又形成天冬氨酸-β-半醛〔$HOOCCH(NH_2)CH_2CHO$，ASA〕，接着与丙酮酸反应，在二氢吡啶二羧酸合酶催化下，生成 2,3-二氢吡啶-2,6-二羧酸

[HOOC–(ring with N)–COOH, DHDP]，又在 Δ'-烯六氢吡啶-2，6-二羧酸脱氢酶催化下，与 NADPH + H^+ 反应生成 $NADP^+$ 和 Δ'-烯六氢吡啶-2，6-二羧酸 [HOOC–(ring with N)–COOH]，后者又与琥珀酰-C_oA、谷氨酸由琥珀酰-二氨基-庚酸转氨酶催化，产生 α-酮戊二酸，获得了 N-琥珀酰-L，L-2，6-二氨基庚二酸（$HOOCCH(NH_2)(CH_2)_3CH(COOH)NHC(=O)(CH_2)_2COOH$〕，获得的产物再由琥珀酰-二氨基庚二酰脱氢酶催化，脱去琥珀酸而生成 L，L-α，ε-二氨基庚二酸〔$HOOCCH(NH_2)(CH_2)_3CH(NH_2)COOH$，DAP〕，最后被二氨基庚二酸差向异构酶和脱羧酶相继催化释放出 CO_2，而转变成〔$H_2NCH(CH_2)_3CH(NH_2)COOH$，Lys〕赖氨酸。该合成反应过程中前三步骤和最后步骤是很关键的。

(2)合成苏氨酸过程中从天冬氨酸开始的前二步骤反应与合成赖氨酸的相同，随后的途径是天冬氨酸-β-半醛由高丝氨酸脱氢酶催化而转化为高丝氨酸〔$HOOCCH(NH_2)CH_2CH_2OH$，HSe〕，再经高丝氨酸激酶催化变为高丝氨酸磷酸〔$HOOCCH(NH)_2CH_2CH_2OPO_3H_2$〕，最后通过四步反应，其中有苏氨酸合成酶参与催化而生成苏氨酸〔$HOOCCH(NH_2)CH(OH)CH_3$，Thr〕。

(3)异亮氨酸的合成是在苏氨酸合成途径基础上完成的，在苏氨酸脱氢酶作用下苏氨酸脱 NH_3 生成 α-酮丁酸〔$CH_3CH_2C(=O)COOH$〕，随后与丙酮酸在乙酰乳酸合酶作用下反应释放 CO_2 而生成 α-乙酰-α-羟丁酸〔$CH_3C(=O)C(OH)(CH_2CH_3)COOH$〕，又经乙酰乳酸变位酶与还原酶的相继作用，辅酶 NAD(P)H + H^+ 变为 $NAD(P)^+$ 的同时，获得产物 α、β-二羟-β-甲基戊酸〔$CH_3CH_2C(OH)(CH_3)CH(OH)COOH$〕，并在二羧酸脱水酶作用下去水而形成 α-酮-β-甲基戊酸〔$CH_3CH_2CH(CH_3)C(=O)COOH$〕，最后在缬氨酸转氨酶催化下与谷氨酸反应，转化为异亮氨酸〔$CH_3CH_2CH(CH_3)CH(NH_2)$-

COOH,Ile]和副产物α-酮戊二酸。

(4)甲硫氨酸(蛋氨酸)的合成也是以天冬氨酸为原料,起始二步骤按合成赖氨酸的途径至生成天冬氨酸-β-半醛后,即按合成苏氨酸途径进行反应至生成高丝氨酸,然后通过高丝氨酸(HSe)在高丝氨酸转酰基酶催促下与琥珀酰-C_oA反应,将琥珀酰基转移,形成o-琥珀酰高丝氨酸[$HOOCCH(NH_2)(CH_2)_2OC(=O)(CH_2)_2COOH$]而释放$C_oA$。继而由胱硫醚-γ-合酶催化,o-琥珀酰高丝氨酸和半胱氨酸反应转化成胱硫醚[$HOOCCH(NH_2,(CH_2)_2CH(NH_2)SCH_2CH(NH_2)COOH$]和琥珀酸。前者进一步在脱硫醚-β-裂合酶作用下加水分解生成高半胱氨酸[$HS(CH_2)_2CH(NH_2)COOH$]、NH_3和丙酮酸。最后在N^5-甲基-FH_4参与反应和转甲基酶作用下生成蛋氨酸[$H_3CS(CH_2)_2COOH$,Met]。

以上四种氨基酸的合成都以天冬氨酸为前体,由天冬氨酸激酶催化而进行第一步反应中,伴随着ATP的参与,导致磷酸基团的转移和能量代谢相偶联。还可看到,合成赖氨酸和蛋氨酸等过程中有琥珀酰-C_oA参与并释放必要的自由能。这些高能键化合物能量的代谢对推动反应进行亦起着关键性作用。

经研究发现,在大肠杆菌(Escherichia coli)的4种氨基酸合成过程中第一步有3种天冬氨酸激酶同工酶,而不同的尾产物能分别对它们进行反馈阻遏和反馈抑制的调控。用作赖氨酸生产菌的黄色短杆菌(Brevibaterium-tlavum)中只有一种天冬氨酸激酶,它仅受赖氨酸和苏氨酸的协同抑制,并使苏氨酸不再进一步生成异亮氨酸。

除了天冬氨酸激酶之外,整个合成过程中还有高丝氨酸脱氢酶和苏氨酸脱氢酶等也都受相应的尾产物氨基酸的反馈调控。

(二)合成鸟氨酸、精氨酸的途径

此途径较复杂,它以谷氨酸为前体,在氨基酸转乙酰基酶催化下,形成N-乙酰谷氨酸[$HOOC(CH_2)_2CH(NHCOCH_3)COOH$],反应有乙酰-$C_oA$参加,提供乙酰基后变为$C_oA$,并伴随着自由能的部分转移。随后在乙酰谷氨酸激酶和ATP变为ADP的作用下,导致N-

乙酰-γ-谷氨酰磷酸〔$(HO)_2P(=O)OC(=O)(CH_2)_2CH(NHCOCH_3)COOH$〕的形成，又通过N-乙酰-γ-谷氨酸磷酸还原酶催化，偶联$NADPH + H^+ \rightarrow NADP^+$反应而脱去Pi，得到的N-乙酰谷氨酸半醛〔$OHC(CH_2)_2CH(NHCOCH_3)COOH$〕进一步经乙酰鸟氨酸转氨酶催化，在谷氨酸参与反应变为α-酮戊二酸的同时转移了$-NH_2$而生成α-N-乙酰鸟氨酸〔$H_2NCH_2(CH_2)_2CH(NHCOCH_3)COOH$〕，接着有二种途径：途径(1)是在谷氨酸参与下，由谷氨酸转乙酰基酶催化，生成L-鸟氨酸和N-乙酰谷氨酸，后者就是L-谷氨酸在第一步反应中的产物，于是组成了所谓鸟氨酸循环；途径(2)是在乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶作用下分解成乙酸和产物L-鸟氨酸。在大肠杆菌中的生物合成过程仅呈现途径(2)。

上述生物合成过程的产物鸟氨酸〔$H_2N(CH_2)_3CH(NH_2)COOH$〕与氨基甲酰磷酸〔$H_2NC(=O)OPO_3H_2$〕在鸟氨酸氨基甲酰转移酶作用下释解出磷酸〔H_3PO_4〕，生成瓜氨酸〔$H_2NC(=O)NH(CH_2)_3CH(NH_2)COOH$〕。此反应过程中的氨基甲酰磷酸是利用$NH_3 + CO_2$在氨基甲酰磷酸合成酶催化下，由$2ATP \rightarrow 2ADP$反应偶联驱动而合成的。瓜氨酸又与天冬氨酸〔$HOOCCH(NH_2)CH_2COOH$〕在$ATP \rightarrow AMP$反应偶联和精氨酸代琥珀酸合成酶作用下，合成了精氨酸代琥珀酸〔$HN=C\left(\begin{array}{c} NHCHCOOH \\ | \\ CH_2COOH \end{array}\right)NH(CH_2)_3CH(NH_2)COOH$〕，再经精氨酸代琥珀酸裂解酶作用裂解为$HOOCCH=CHCOOH$和产物精氨酸。但精氨酸可在精氨酸酶作用下进一步裂解为鸟氨酸〔$H_2N(CH_2)_3CH(NH_2)COOH$〕和产物尿素〔$(H_2N)_2C=O$〕。鸟氨酸又可与氨基甲酰磷酸反应而组成尿素循环。

此外，还有些机体鸟氨酸可由谷氨酸-γ-半醛＋天冬氨酸$\xrightleftharpoons{\text{鸟氨酸转氨酶}}$鸟氨酸＋草酰乙酸反应直接生成。

(三)丙酮酸为前体生物合成缬氨酸和亮氨酸

(1)缬氨酸合成途径是丙酮酸两分子间通过乙酰乳酸合酶催化，

脱出一分子 CO_2 而连接成 α-乙酰乳酸〔$H_3CC(=O)C(CH_3)(OH)COOH$〕后，连续经乙酰乳酸变位酶、还原酶和二羟酸脱水酶催化，具体变化可参见合成异亮氨酸途径中有关相应酶的催化反应。由此得到的 α-酮异戊酸〔$H_3CCH(CH_3)C(=O)COOH$〕是合成缬氨酸的原料，也可沿另一途径合成亮氨酸。缬氨酸的合成是缬氨酸转氨酶存在时 α-酮异戊酸与谷氨酸反应生成 α-酮戊二酸和缬氨酸〔$H_3CCH(CH_3)CH(NH_2)COOH$，Val〕。

(2)亮氨酸的合成是由 α-酮异戊酸按另一途径进行反应，即 α-酮异戊酸与乙酰-C_oA 由 α-异丙基苹果酸合酶催化生成 α-异丙基苹果酸〔$HOOCCH_2C(OH)(COOH)CH(CH_3)_2$〕。并进一步由 α-异丙基苹果酸脱水酶催化转变成 β-异丙基苹果酸〔$HOOCCH(OH)CH(COOH)CH(CH_3)_2$〕，随后在异丙基苹果酸脱氢酶作用下，于 NAD^+ 参与反应生成 $NADH+CO_2$ 的同时，变为 α-酮异己酸〔$HOOCC(=O)CH_2CH(CH_3)_2$〕，最后由亮氨酸转氨酶催化，与谷氨酸反应形成 α-酮戊二酸和产物亮氨酸〔$HOOCCH(NH_2)CH_2CH(CH_3)_2$，Leu〕。

缬氨酸和亮氨酸也能分别反馈抑制乙酰乳酸合酶和 α-异丙基苹果酸合酶。

(四)色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸等芳香族氨基酸的合成

这条合成途径是以糖酵解的中间产物磷酸烯醇式丙酮酸〔$HOOCC(=CH_2)OPO_3H_2$〕、糖氧化磷酸戊糖途径的中间产物赤藓糖-4-磷酸〔$OHCCH(OH)CH(OH)CH_2OPO_3H_2$〕为起始反应物，在磷酸-2-酮-3-脱氧庚糖酸醛缩酶(发现有 3 种同工酶)催化下进行加 H_2O 脱磷酸反应，合成了 3-脱氧-α-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸〔$HOOCC(=O)CH_2CH(OH)C(OH)HC(OH)HCH_2OPO_3H_2$〕。随后在脱氢奎尼酸合酶作用下脱磷酸环化生成准备形成芳香核的5-脱氢奎尼酸，即〔$HOOCC(OH)CH_2CH(OH)CH(OH)C(=O)CH_2$〕，又经 5-脱氢奎尼酸脱水酶作用变为 3-脱氢莽草酸〔$HOOCC{=}CHC(=O)CH(OH)CH(OH)CH_2$〕。再进一步通过莽草酸

脱氢酶催化和 NADPH + H^+ → $NADP^+$ 反应参与下变为莽草酸



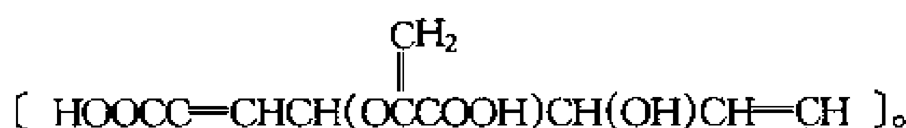
〔$HOOCC{=}CHCH(OH)CH(OH)CH(OH)CH_2$〕,接着在莽草酸激酶作用下 ATP 变为 ADP,并将磷酸基团转移给莽草酸而形成莽草酸-3-磷



酸〔$HOOCC{=}CHCH(OPO_3H_2)CH(OH)CH(OH)CH_2$〕,然后在磷酸烯醇式丙酮酸参与下,由丙酮酰莽草酸磷酸合酶催化脱磷酸基团合成

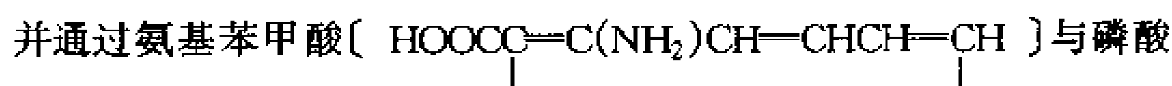


〔$HOOCC{=}CHCH(OPO_3H_2)CH(OH)CH(OC({=}CH_2){-}COOH)CH_2$〕,又经分枝酸合成酶催化解脱磷酸而得到分枝酸

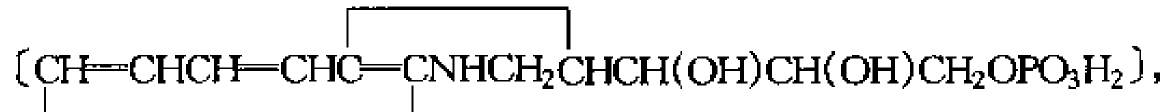


〔$HOOCC{=}CHCH(OC({=}CH_2)COOH)CH(OH)CH{=}CH$〕。

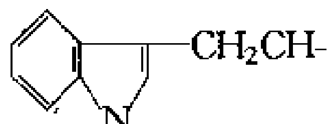
由分枝酸起始,从两条途径分别合成色氨酸以及酪氨酸和苯丙氨酸。合成色氨酸这条途径是先让分枝酸与谷氨酰胺(Gln)在氨基苯甲酸合酶存在时反应,生成谷氨酸(Glu)、丙酮酸和氨基苯甲酸。并通过氨基苯甲酸



〔$HOOCC{=}C(NH_2)CH{=}CHCH{=}CH$〕与磷酸核糖焦磷酸(PRPP)被氨基苯甲酸转磷酸核糖酶催化,脱去焦磷酸和合成烯醇式-10-羧基苯氨基-1-脱氧核酮糖磷酸〔ortho—$HOOCC_6H_4NHCH = C(OH)CH(OH)CH(OH)CH_2OPO_3H_2$〕。随后经吲哚-3-甘油磷酸合酶作用,释放 H_2O 与 CO_2 而生成哚-3-甘油磷酸



〔$CH{=}CHCH{=}CHC{=}CNHCH_2CHCH(OH)CH(OH)CH_2OPO_3H_2$〕,最后由色氨酸合酶催化与丝氨酸合成色氨酸〔



$(NH_2)COOH$,Trp〕。

另一条合成酪氨酸和苯丙氨酸的途径是首先在分枝酸变位酶作用下,分枝酸变为预苯酸



〔$HOOCC({=}O)CH_2$

C(COOH)CH═CHCH(OH)CH═CH 〕,然后分别以不完全相同的途径合成酪氨酸和苯丙氨酸。

由预苯酸与 NAD^+ 在预苯酸脱氢酶催化下生成 NADH、CO_2 和对羟苯丙酮酸〔HOOCC(═O)C═CHCH═C(OH)CH═CH〕,而 $NAD^+ \rightarrow NADH$ 反应可以提供部分能量,最后与谷氨酸在转氨酶作用下反应,产生 α-酮戊二酸和酪氨酸〔HOOCCH(NH_2)C═CHCH═C(OH)CH═CH〕。预苯酸的另一反应是在预苯酸脱水酶催化下除去 H_2O 和 CO_2 变为苯丙酮酸〔HOOCC(═O)CH_2C═CHCH═CHCH═CH〕,接着也在转氨酶催化下,与谷氨酸反应产生 α-酮戊二酸和苯丙氨酸〔HOOCCH(NH_2)CH_2C═CHCH═CHCH═CH〕。

这些芳香族氨基酸合成系统中有关的酶往往会构成多酶复合体,几种多酶复合体又能以次级键组成更高一级的"超级多酶复合物",因而呈现出催化效率的提高和有利于避免副反应。不过,系统中有关第一步和分枝酸进行反应过程有关酶的催化功能也受尾产物的反馈调控。

(五)组氨酸的生物合成

组氨酸的生物合成是以糖氧化代谢中磷酸戊糖循环途径的中间产物核糖-5-磷酸为原料,先通过核糖-5-磷酸焦磷酸激酶催化形成磷酸核糖焦磷酸〔ⓟOCH$_2$CHCH(OH)CH(OH)CH(OⓅⓅ),PRPP〕。随后在ATP转磷酸核糖酶作用下ATP脱去焦磷酸的AMP与脱去焦磷酸的磷酸核糖合成 N-(5′-磷酸核糖)AMP〔ⓅOCH$_2$CHCH(OH)CH(OH)CH—NCH═NC═CN═CHN═CN-

$H(CHCHOHCHOHCHCH_2O$Ⓟ］。此反应是由脱去焦磷酸〔ⓅⓅ〕所释放的自由能，作化学功提供活化能驱动进行的。接着受磷酸核糖-AMP 环化水解酶催化生成磷酸核酮糖亚胺甲基-5-氨基咪唑甲酰胺核苷酸〔$H_2O_3POCH_2CH(OH)CH(OH)C(=O)CH(OH)NHCH=NC=C(CONH_2)N=CHN$—核糖—Ⓟ〕，又在磷酸核酮糖亚胺甲基-5-氨基咪唑甲酰胺核苷酸异构酶催化下转化为磷酸核酮糖亚胺甲基-5-氨基咪唑甲酰胺核苷酸异构物〔$H_2O_3POCH_2CH(OH)CH(OH)C(=O)CH_2NHCH=NC=C(CONH_2)N=CHN$—核糖—Ⓟ〕。然后与谷氨酰胺反应而释出 $H_2NC=C(CONH_2)N=CHN$—核糖—Ⓟ、谷氨酸以及形成咪唑甘油磷酸〔$H_2O_3POCH_2CH(OH)CH(OH)C=CHN=CHNH$〕。后者由咪唑甘油磷酸脱水酶催化而转变成咪唑丙酮醇磷酸〔$H_2O_3POCH_2C(=O)CH_2C=CHN=CHNH$〕。又经组氨醇磷酸转氨酶催化与谷氨酸反应生成 α-酮戊二酸和 L-组氨醇磷酸〔$H_2O_3POCH_2CH(NH_2)CH_2C=CHN=CHNH$〕。再通过组氨醇磷酸酶作用使之变为 L-组氨醇〔$HOCH_2CH(NH_2)CH_2C=CHN=CHNH$〕。进一步被组氨醇脱氢酶催化而转为 L-组氨醛〔$OHCCH(NH_2)CH_2C=CHN=CHNH$〕。最后 $NAD^+ \rightarrow NADH$ 参与反应，并提供能量，以及由组氨醇脱氢酶催化生成组氨酸(His)。组氨酸达到一定浓度后会反馈抑制核糖-5-磷酸焦磷酸激酶的活性。

由上可知，氨基酸生物合成过程的尾产物都会呈现反馈阻遏与反馈抑制的调控效应。当该尾产物达到一定浓度时，它们便能对代谢途径中关键的限速环节(往往是第一步)的酶催化合成活性产生阻

遏和抑制作用。例如，赖氨酸等合成系统和芳香族氨基酸合成系统都含3种同工酶于第一步起作用，但它却接受不同尾产物的控制，人们称为同工酶式调节；又如黄色短杆菌中赖氨酸等合成系统的第一步会受赖氨酸和苏氨酸两者的协同控制，但任何一种氨基酸未达到一定浓度水平均会引起另一种不能单独发挥抑制作用。这种是属于协同式调节；还有的称作累加式调节，合成系统中每一种尾产物都能产生部分的反馈抑制，这些效应是可叠加的。此外，苏氨酸与甲硫氨酸、芳香族氨基酸等合成系统中分支途径的第一步骤酶也受相应尾产物的调控。这样的生理机制就能使机体内氨基酸的合成控制在一定浓度水平上，也有利于合成蛋白质的调控。

9.2 碱基和核苷酸的供应

生物体内所需要的碱基和核苷酸也和氨基酸类似，有两种来源的途径，即通过核酸酶等降解食物与细胞内的核酸获取和通过生物合成来供应。

9.2.1 核酸的降解

动物可以分泌水解酶类来分解食物中的核蛋白和核酸类物质；植物一般不能消化体外的有机物质。

生物中普遍存在分解核酸的酶系统。核酸的降解需要三类酶发挥不同的作用以获取三种降解水平的产物，即核酸酶催化水解核酸，产物是核苷酸；核苷酸由核苷酸酶催化脱磷酸获得核苷；核苷经核苷酶作用化为碱基(嘌呤、嘧啶)和戊糖。

核酸酶是水解RNA和DNA中磷酸二酯键的酶类，属磷酸二酯酶，它能使核酸内部连接核苷酸的磷二酯键水解断裂产生低级多核苷酸或单核苷酸。这种核酸内切酶根据它们对RNA和DNA的专一性，可分为作用于DNA的脱氧核糖核酸酶(DNase)和作用于RNA的核糖核酸酶(RNase)。其中胰RNase、霉菌RNase T_1、细菌RNase U_2等对碱基呈现一定的专一性。胰DNase Ⅰ、黑曲霉核酸酶

(nuclease S_1)、胸腺和脾脏 DNase Ⅱ、微球菌核酸酶(micrococcus nuclease,MN)等对碱基选择性不高,不过 DNase Ⅰ、S_1 的作用会游离出 5′-磷酸寡(或单)核苷酸而 DNase Ⅱ、MN 切断位置不同,会产生 3′-磷酸寡(或单)核苷酸。

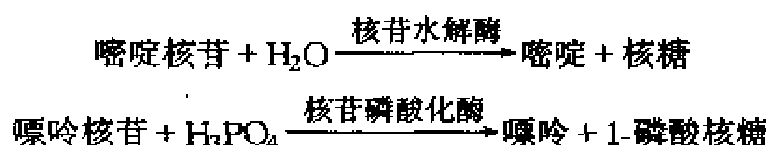
在细菌中存在一类能严格识别 DNA 特定核苷酸顺序的限制性内切核酸酶,它能在特定顺序处切开核苷酸间的键使 DNA 产生双链裂口,进而由 DNase 水解。这类酶在体内的功能是分解外源 DNA,它对维护 DNA 在生物体内正常新陈代谢、分子生物学研究和基因工程应用发挥着极为重要的作用。

另有一些对 DNA 和 RNA 都能起水解作用,而专一性较低的磷酸二酯酶,这类能从 DNA 和 RNA(或其低级多核苷酸)链的一端逐个水解产生单核苷酸,所以称作核酸外切酶,有从 3′-羟基端逐个切下 5′-核苷酸的 3′-末端外切酶,如蛇毒磷酸二酯酶;还有从 5′-羟基端逐个切下 3′-核苷酸的 5′-末端外切酶,如脾磷酸二酯酶。

通常,细胞内 RNA 的代谢较活跃,而 DNA 可能被甲基化保护而较稳定,但细胞内 DNase 含量丰富,估计以分解外源 DNA 为其主要功能。

核酸的水解产物各种单核苷酸在细胞内由磷酸单酯酶类的核苷酸酶水解成为核苷和磷酸。其中非专一性的磷酸单酯酶能水解一切核苷酸,高专一性的核苷酸酶有分别只能作用于 5′-核苷酸和 3′-核苷酸两种。

核苷的进一步分解过程及其产物在各种动物体内略有不同。通常,核苷酶有两种——水解酶型和磷酸化酶型。一般地说,核苷经核苷酶催化分解为碱基和核糖。



1-磷酸核糖能转变为 5-磷酸核糖,机体中过剩的量还可进一步分解代谢。

9.2.2 嘌呤核苷酸的生物合成

通常，动物、植物或微生物都能自身合成各种嘌呤和嘧啶核苷酸。在细胞内合成的基本途径有两类：一类是“从头合成”途径，核苷酸是由氨基酸、CO_2、NH_3 和核糖磷酸等化合物合成的。另一类是称作转变途径或补救途径，它是以核酸分解产生的碱基和核苷为原料，通过各种不同的转变路线完成合成。碱基和核苷可以是内源或外源的。在细菌、植物和动物细胞内常以核酸分解得到的为主要来源。在遗传原因、疾病、药物、毒物甚至生理紧张或失调都能引起从头合成核苷酸途径中某些酶失活或缺乏，致使从头合成核苷酸不能满足细胞生长的需要。此时补救途径将成为维持生命所必需。

使用同位素标记的各种营养物喂鸽子等营养实验，进行体内转化同位素标记跟踪结果表明，嘌呤环酸的碳 4、碳 5 和氮 7 来自甘氨酸，甲酸(一碳基)是其碳 2 和碳 8 的来源，碳酸氢盐(或 CO_2)是碳 6 的来源，氮 1 来自天冬氨酸的氨基氮，氮 3 和氮 9 来自谷氨酰胺的酰胺氮，参见图 9-1。后两者的氮常与细胞内 NH_3 的相混还不能用完整细胞或机体进行营养实验来证实。

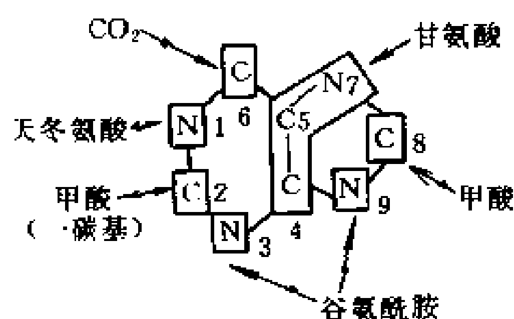


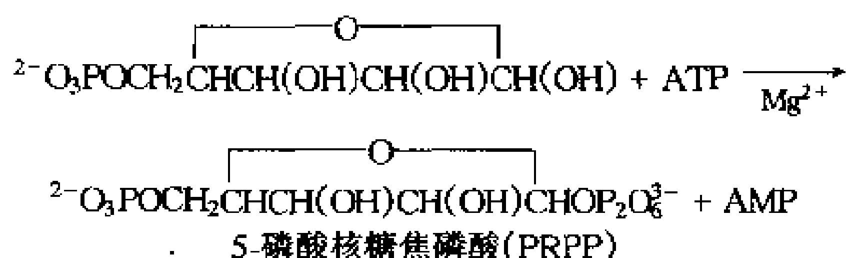
图 9-1　嘌呤环核各原子的来源

(一)嘌呤核苷酸从头合成途径

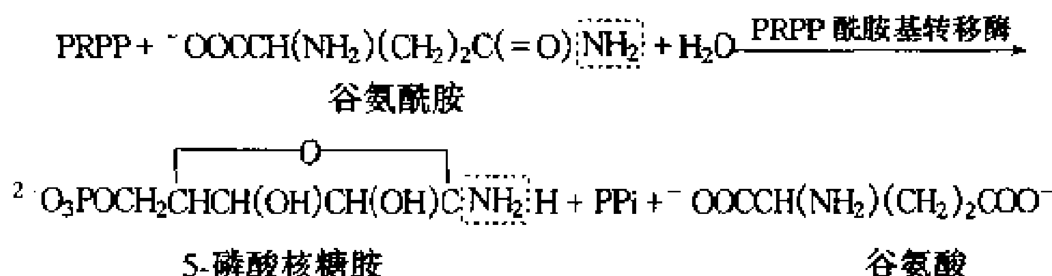
Greenberg 等在 50 年代已基本弄清从头合成嘌呤的途径，此途径是在核糖-5-磷酸的 1′号位碳原子上逐步加成上述碳氮前体物质而得次黄嘌呤核苷酸的，然后再转变为腺苷酸和鸟苷酸，具体步骤如下：

(1)次黄苷酸的合成

(A)从 5-磷酸核糖焦磷酸出发，它是由 ATP 和核糖-5-磷酸在磷酸核糖焦磷酸激酶作用下反应生成的，即

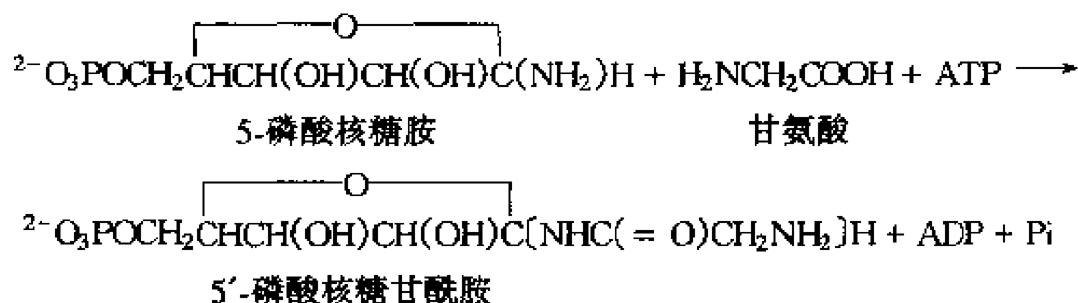


(B)5-磷酸核糖焦磷酸通过磷酸核糖焦磷酸酰胺基转移酶催化，可与谷氨酰胺反应生成5-磷酸核糖胺、谷氨酸和无机焦磷酸(PPi)，即

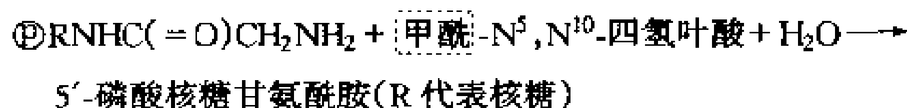


在此反应过程中α-构型核糖化合物转变为β-构型。

(C)酰胺的生成是由磷酸核糖甘氨酰胺合成酶催化，5-磷酸核糖胺在ATP参与下和甘氨酸反应完成的，反应产物是5′-磷酸核糖甘氨酰胺、ADP和Pi，即



(D)甲酰基转移生成5′-磷酸核糖-N-甲酰甘氨酰胺的反应是通过磷酸核糖甘氨酰胺甲酰基转移酶催化，引起甲酰基供体N^5，N^{10}-四氢叶酸转移甲酰基给5′-磷酸核糖甘氨酰胺，形成了嘌呤环骨架的4、5、7、8、9位顺序，即



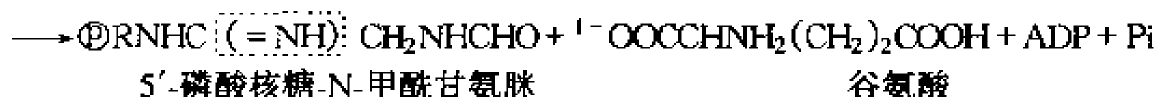


5'-磷酸核糖-N-甲酰甘氨酰胺

(E)由 ATP 提供自由能作化学功和磷酸甲酰甘氨脒合成酶催化下，自谷氨酰胺的酰胺基引入氮原子于 3 号位，反应产物为 5'-磷酸核糖-N-甲酰甘氨脒，即



5'-磷酸-N-甲酰甘氨酰胺　　　　谷氨酰胺

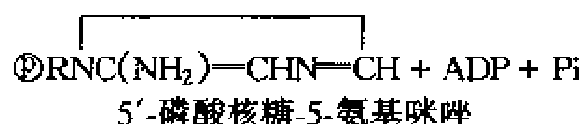


5'-磷酸核糖-N-甲酰甘氨脒　　　　谷氨酸

(F)ATP 脱去-磷酸而提供能量，在磷酸核糖氨基咪唑合成酶催化下促进闭环反应，即

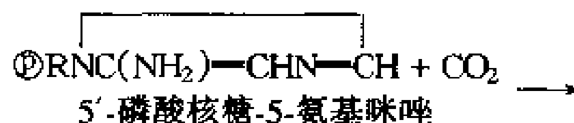


5'-磷酸核糖-N-甲酰甘氨脒

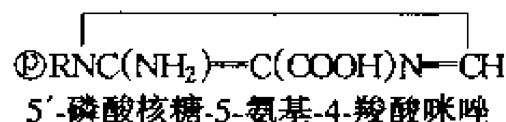


5'-磷酸核糖-5-氨基咪唑

(G)在磷酸核糖氨基咪唑羧化酶作用下，5'-磷酸核糖-5-氨基咪唑可与 CO_2 反应而引入嘌呤环第 6 位碳原子，生成 5'-磷酸核糖-5-氨基-4-羧酸咪唑，即

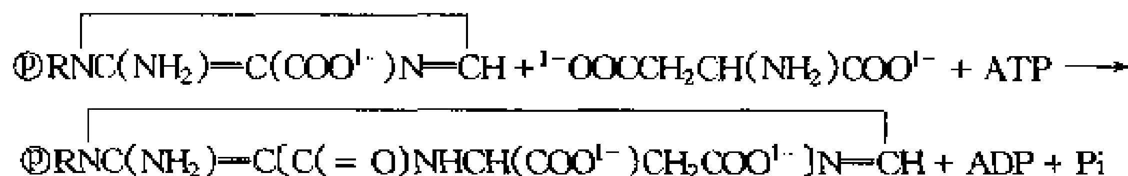


5'-磷酸核糖-5-氨基咪唑

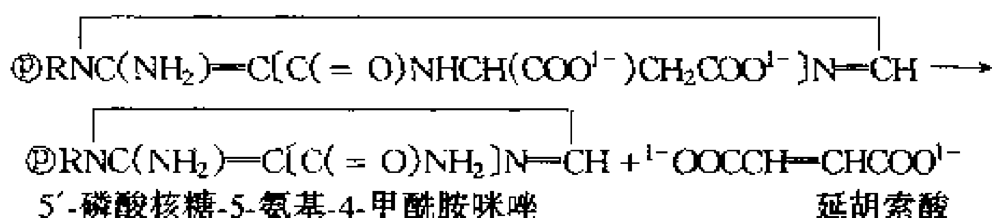


5'-磷酸核糖-5-氨基-4-羧酸咪唑

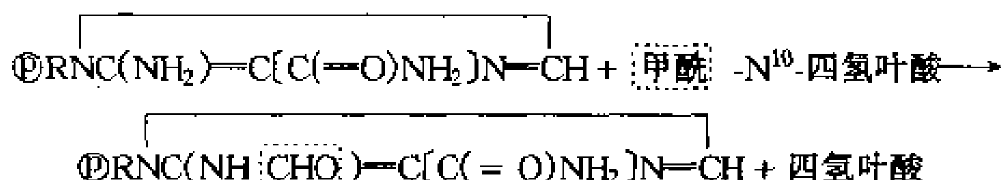
(H)在 ATP 参与下，通过磷酸核糖氨基咪唑琥珀酸甲酰胺合成酶催化，上述生成物进一步与天冬氨酸反应而合成 5'-磷酸核糖-5-氨基-4-(N-琥珀酸甲酰胺)咪唑，其反应式如下：



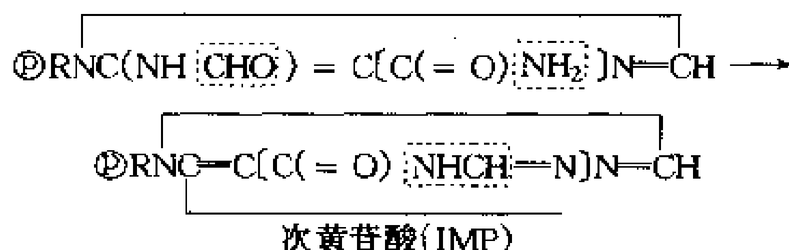
(I)产物进一步经腺苷酸裂解酶催化而脱去延胡索酸，其反应式如下：



(J)由磷酸核糖氨基咪唑甲酰胺甲酰基转移酶作用和甲酰基供体N^{10}-甲酰四氢叶酸提供甲酰基团成为嘌呤环上第2号位(也是接入将形成嘌呤环上最后的)碳原子，即



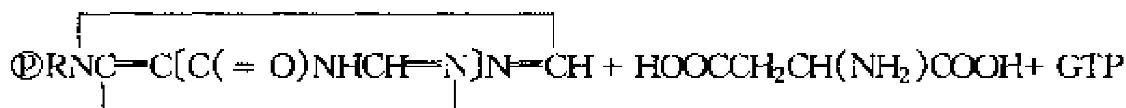
(K)第(J)步反应产物5′-磷酸核糖-5-甲酰胺基-4-氨甲酰咪唑在次黄苷酸环水解酶催化下进行脱水环化反应，形成次黄苷酸(IMP)，即

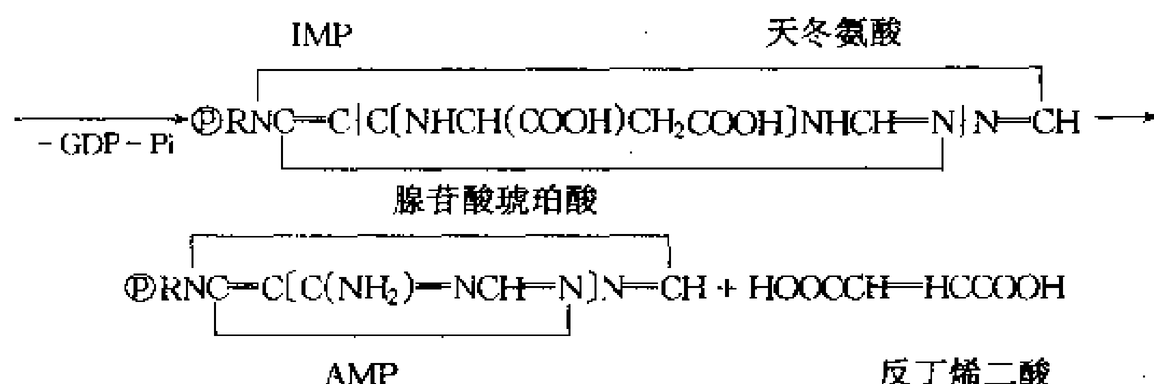


以上许多反应步骤中都需要ATP参与反应偶联，提供能量作功。可以认为，ATP物质在生物体合成代谢中具有极其重要的地位。

(2)腺(嘌呤核)苷酸(AMP)的合成

腺苷酸是以次黄苷酸为前体，在GTP存在下，与天冬氨酸由腺苷酸琥珀酸合成酶催化合成中间产物腺苷酸琥珀酸，随后就在腺苷酸琥珀酸裂解酶的催化下，分解成腺苷酸和延胡索酸(即反丁烯二酸)，其过程可表达为

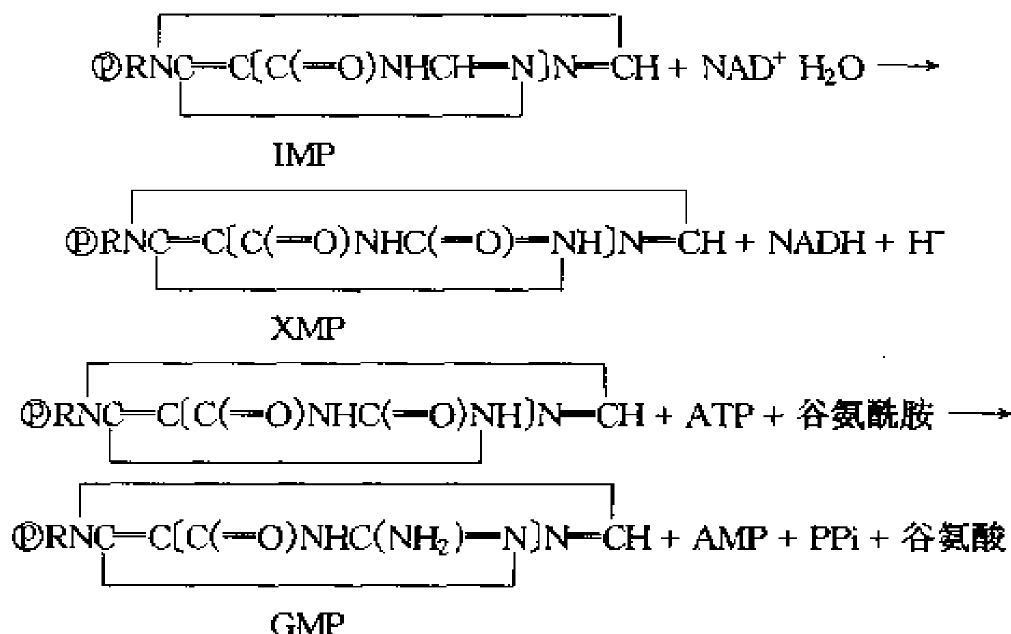




上述 GTP→GDP + Pi 偶联反应所提供能量推动了 AMP 合成的进行。

(3)鸟苷酸(GMP)的合成

鸟(嘌呤核)苷酸的合成是 IMP 在 IMP 脱氢酶催化下，先将第 2 位碳氧化为 >C═O 而生成黄苷酸(XMP)，随后再经 GMP 合成酶作用，使氨基化而形成鸟苷酸(GMP)，此反应过程如下：



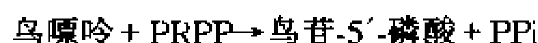
(二)嘌呤核苷酸合成的补救途径

合成嘌呤核苷酸的补救途径，即是利用核酸的分解产物嘌呤碱或嘌呤核苷等嘌呤衍生物进行重新合成。肝脏中有腺嘌呤磷酸核糖基转移酶，它可催化游离的腺嘌呤碱基直接和 5-磷酸核糖焦磷酸(PRPP)反应合成腺苷-5′-磷酸。



肝脏中还有次黄嘌呤(或鸟嘌呤)磷酸核糖基转移酶,它能催化次黄嘌呤或鸟嘌呤与 PRPP 合成次黄苷-5′-磷酸或鸟苷-5′-磷酸。





上述生物合成过程所释放的焦磷酸很快被焦磷酸酶催化而水解。

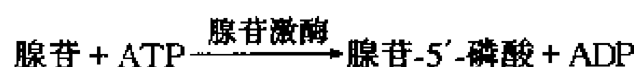
其它有关游离嘌呤碱基转化为核苷和核苷转变成核苷酸的补救途径有:

(1)嘌呤核苷磷酸化酶催化嘌呤核苷的生成,例如:





(2)核苷转变成核苷酸类型的反应,例如:



9.2.3 嘧啶核苷酸的生物合成

应用同位素标记的各种化合物进行体内转化实验表明,嘧啶环上的碳和氮原子是分别由 NH_3、CO_2 和天冬氨酸提供的,见图 9-2。

(一)从头合成嘧啶核苷酸

实验表明,嘧啶核苷酸的从头合成可概括为 4 个阶段,第一阶段是合成含嘧啶环的 6-羧基尿嘧啶,它是关键的中间化合物,通称乳清酸;随后阶段是形成乳清酸核苷酸;第三阶段再转化为尿嘧啶核苷酸;最后进一步转化为其它核苷酸。

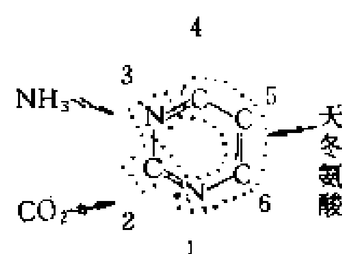


图 9-2 嘧啶核上各原子的来源

(1)乳清酸的形成分 4 步反应完成:

(A)首先由 NH_3(或谷氨酰胺)和 CO_2 在 2ATP→2ADP 反应偶联及自由能供应下,由氨基甲酰磷酸合成酶催化而形成氨甲酰磷酸〔$H_2NC(=O)O$Ⓟ〕。

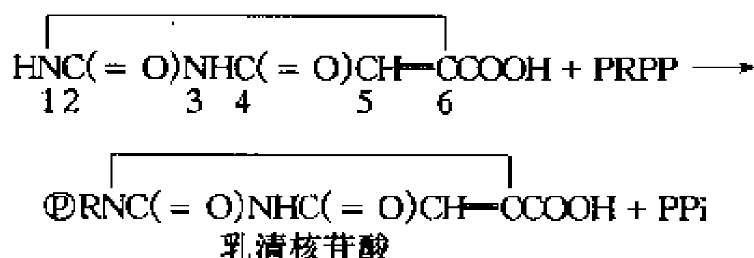
(B)氨甲酰磷酸在天冬氨酸转氨甲酰酶催化下,与 L-天冬氨酸反应,脱去磷酸基团(Pi),合成氨甲酰天冬氨酸〔$H_2NC(=O)NHCH$

(COOH)CH_2C(=O)OH]。

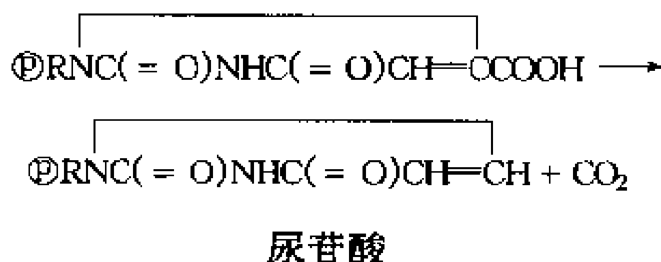
(C)氨甲酰天冬氨酸在二氢乳清酸酶作用下脱 H_2O 环化，形成二氢乳清酸 HNC(=O)NHC(=O)CH_2CH(COOH)。

(D)二氢乳清酸脱氢酶(是一种黄素蛋白)催化脱氢(-2H)，将二氢乳清酸转化为乳清酸 HNC(=O)NHC(=O)CH=CCOOH。

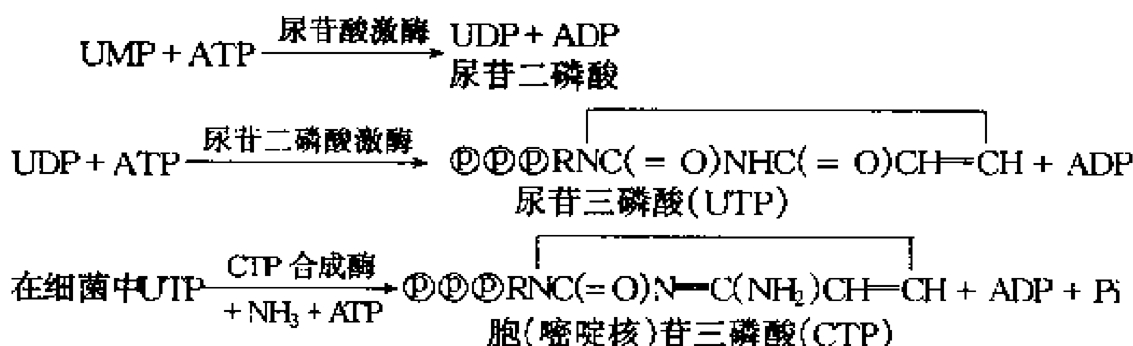
(2)乳清核苷酸的形成是由乳清核苷酸焦磷酸化酶催化，通过5′-磷酸核糖焦磷酸(PRPP)提供核糖磷酸而完成反应的。



(3)尿嘧啶核苷酸的生成是通过乳清核苷酸脱羧酶作用，催化乳清核苷酸脱去羧基而转化成的，即



(4)转化其它核苷酸的过程除了酶催化外，尚需 ATP 参与提供磷酸基团及释放自由能作化学功。



在动物中 UTP + 谷氨酰胺(Gln) + ATP $\xrightarrow{\text{CTP 合成酶}}$ CTP + 谷氨酸(Glu) + ADP + Pi

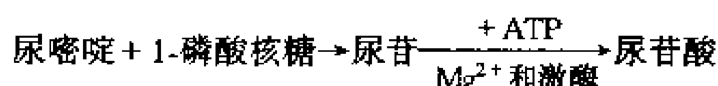
(二)嘧啶核苷酸生物合成的补救途径

嘧啶核苷酸和嘌呤核苷酸类似,也可从已有的嘧啶碱基或嘧啶核苷通过补救途径合成。

尿嘧啶由尿嘧啶磷酸核糖基转移酶催化,在动物及微生物细胞中和 PRPP 反应生成 UMP,而胞嘧啶不是该酶的底物。

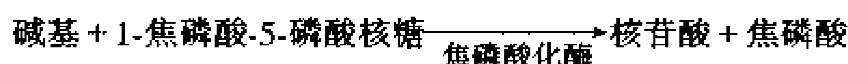


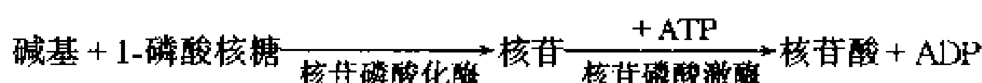
另一条补救途径是尿嘧啶和 1-磷酸核糖在尿苷磷酸化酶作用下合成尿苷,再进一步在 ATP 参与下经尿苷磷酸激酶和 Mg^{2+} 的作用,可以生成尿苷酸,或者直接从尿苷由激酶和 Mg^{2+} 作用,ATP 参与反应也能得到尿苷(-5′-磷)酸,反应式如下:



直接从尿苷由激酶催化转化为尿苷酸的反应还可适用于胞苷为底物,但对于次黄苷是不适用的。

根据上述反应过程,可概括为两条补救途径:

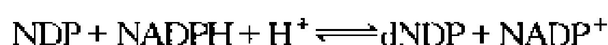




9.2.4 脱氧核苷酸的生物合成

脱氧核苷酸的生物合成首先是以上述四种核糖核苷酸(腺苷酸、鸟苷酸、胞苷酸和尿苷酸)为前体,通过核苷酸激酶作用分别变成相应的核糖核苷二磷酸,随后在核糖核苷酸还原酶系催化下还原,在核糖 2 号位碳上脱氧,生成相应的脱氧核苷酸,反应概括如下:





ATP 的参与为上述反应提供磷酸基团和能量。NADPH 的参与是让核糖核苷酸还原酶系中氧化型硫氧化还原蛋白恢复还原型,以利于

再还原 NDP。

图 9-3 显示了在真核生物与原核生物中发现的核糖核苷酸还原酶系作用机制(以大肠杆菌中核苷二磷酸还原酶催化反应为例)。该还原酶系由 4 种蛋白组成,即作为还原剂的还原型硫氧还蛋白或氧化型硫氧还蛋白、硫氧还蛋白还原酶、蛋白质 B_1 和 B_2。其中还原型硫氧还蛋白是含 108 个氨基酸残基的多肽,其活性基团是两个半胱氨基酸残基,可被氧化成胱氨酸。氧化型硫氧还蛋白在硫氧还蛋白还原酶的作用下仍可被 NADPH 还原;硫氧还蛋白还原酶是一种以 FAD 为辅基的黄素蛋白;蛋白质 B_1 和 B_2 为核糖核苷酸还原酶(属别构酶)的两个亚基,B_1 为这种别构酶的调节亚基。

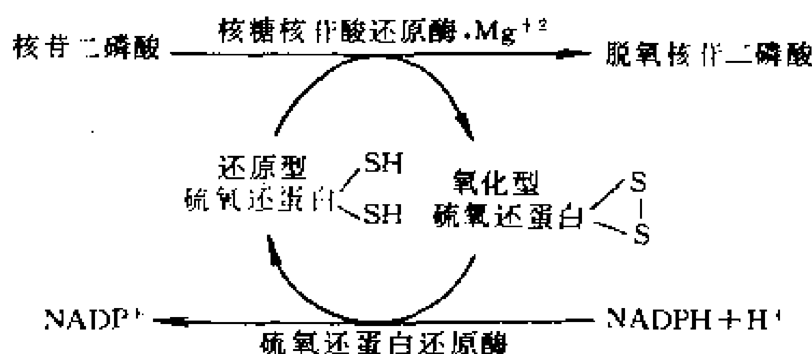


图 9-3　脱氧核苷酸的生物合成

动物组织、高等植物和肿瘤细胞中的核糖核苷酸还原酶和大肠杆菌中的类似,也以核苷二磷酸为底物,仍以硫氧还蛋白为还原剂。但许多原核细胞(如乳酸杆菌、枯草杆菌等)中的 NDP 还原酶是以核苷三磷酸为底物,还原剂是含维生素 B_{12}的一种辅酶。

胸腺嘧啶脱氧核苷酸的生物合成是通过脱氧尿苷酸在嘧啶环第 5 碳上进行甲基化($-CH_3$ 取代 H)而转化的。这转化反应是由 dTMP 合成酶催化,而 N^5、N^{10}-亚甲基-四氢叶酸(N^5,N^{10}-CH_2-FH_4)是甲基供体,生成物为胸苷酸(dTMP)和二氢叶酸(FH_2)。二氢叶酸在二氢叶酸还原酶催化下,可与 NADPH 反应而得氢后还原为四氢叶酸(FH_4),随后经丝氨酸羟甲基转移酶催化生成 N^5,N^{10}-CH_2-FH_4,可参见图 9-4。

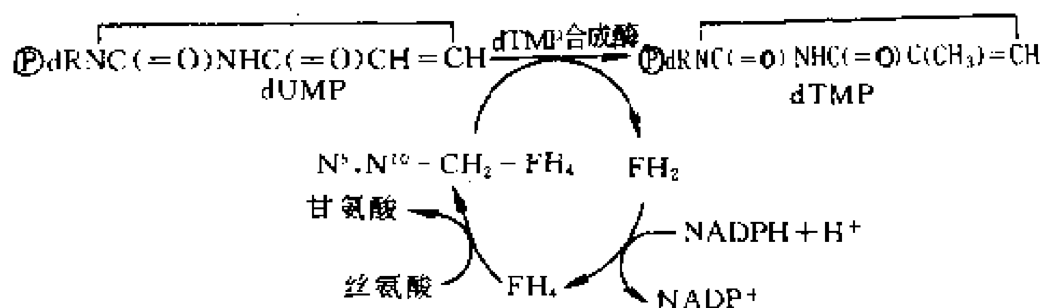


图 9-4 dTMP 的生物合成
(dR 代表脱氧核糖)

还有一种低专一性的核苷二磷酸激酶能催化核糖核苷酸(NDP)与脱氧核糖核苷酸(dYTP)间的互变。



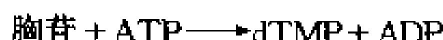
NDP + dYDP ⇌ dNDP + YDP

胸腺嘧啶转变成相应核苷酸的反应含有两个步骤,首先是胸苷磷酸化酶催化胸腺嘧啶转化为胸苷。



胸腺嘧啶 + 脱氧核糖-1-磷酸 ⇌ 胸苷 + Pi

随后由胸苷激酶催化合成胸苷酸。



胸苷 + ATP ⟶ dTMP + ADP

这是一种合成 dTMP 的补救途径,脱氧核糖-1-磷酸往往可从其它脱氧核苷经磷酸解作用而产生。



脱氧核苷 + Pi ⇌ 脱氧核糖-1-磷酸 + 碱基

利用上述反应参入标记胸腺嘧啶或标记胸苷于合成 DNA 的实验中,可作为鉴定技措。

9.2.5 单核苷酸生物转化为核苷三磷酸

核苷-磷酸需先转化为相应的核苷三磷酸后,才再参与 RNA 或 DNA 的合成,而不是直接参与核酸的生物合成。在核苷-磷酸转化为相应的核苷三磷酸反应中要经过转化成核苷二磷酸的中间过程。此中间过程是由相应的激酶催化,这些激酶对碱基具有专一性而对其底物含核糖或脱氧核糖无特异性,现举例如下:



AMP(或 dAMP) + ATP $\xrightarrow{\text{(脱氧)腺苷酸激酶}}$ ADP(或 dADP) + ADP

概括上述类型的反应通式为



核苷二磷酸由另一种对碱基和核糖都没有专一性的激酶催化，从而转化成核苷三磷酸的。三磷酸中磷酸供体是ATP，并由它转移活化自由能，促进该反应的进程。



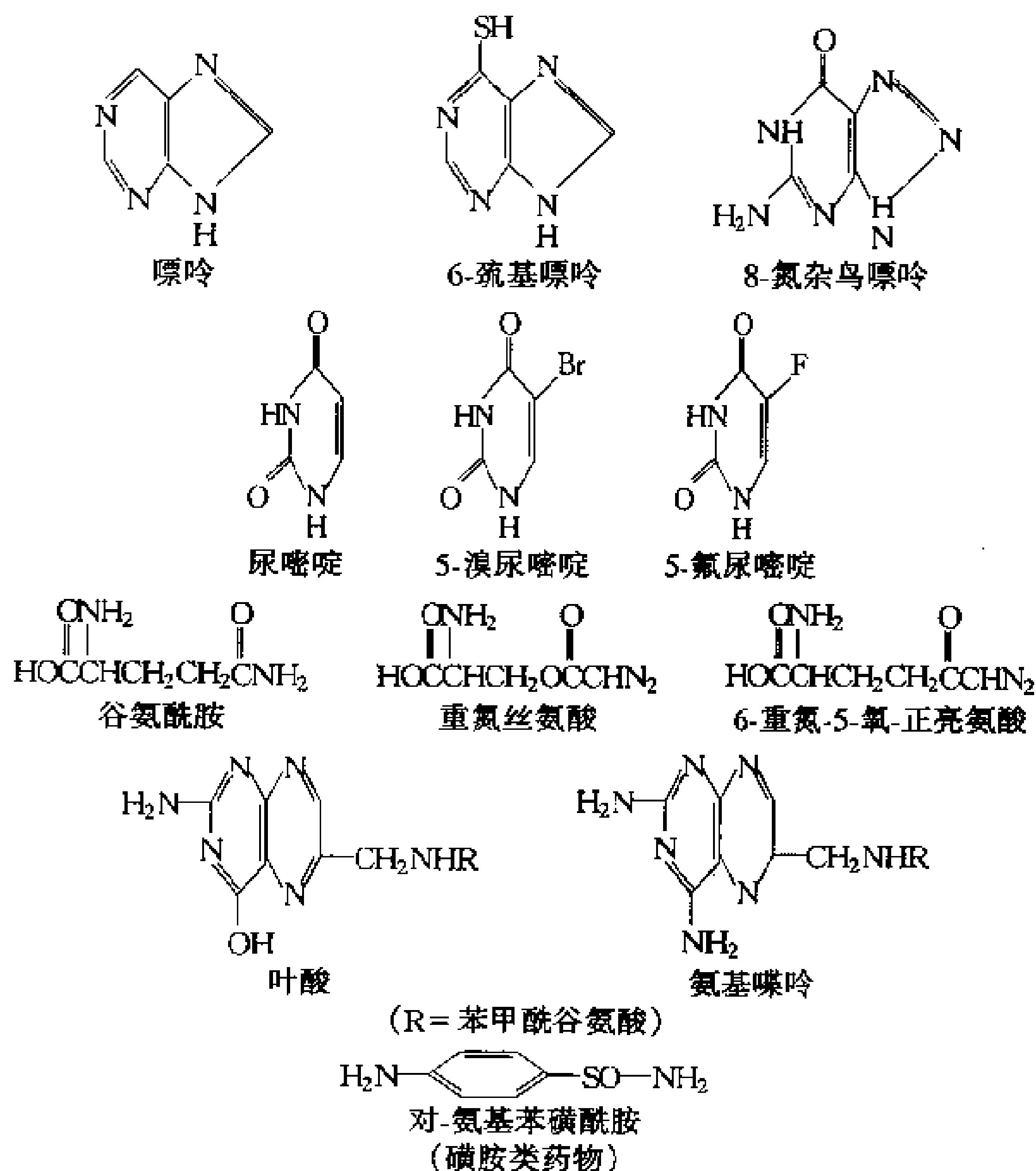
9.2.6 核苷酸生物合成的抑制剂

嘌呤核苷酸或嘧啶核苷酸的合成除了都受相应核苷酸产物的反馈调节外，也受某些抗代谢类似物的抑制。由于抑制核苷酸生成便能直接导致阻止核酸的合成，于是努力研究和开发一些适宜的肿瘤治疗药物和免疫抑制剂等抗代谢物已是当今世界范围的重要课题。

现在，人们已常用控制胸苷酸合成的方法来抑制DNA合成和快速增殖的肿瘤细胞的生长。例如，氟化脱氧尿苷酸(可从投入人体的氟化尿嘧啶或氟化脱氧尿苷，经补救途径生成)，是可以抑制胸苷酸合成酶活性的抑制剂，适量的氨甲蝶呤或氨基蝶呤可完全抑制二氢叶酸还原酶的催化活性。它们的抑制机制大概能与酶生成共价化合物，掩盖了酶上催化活性基团结构而使酶钝化。

抑制剂大体上可分为3种类型：(1)碱基类似衍生物，如6-巯基嘌呤(6MP)、6-氯嘌呤(6CP)、8-氮杂鸟嘌呤(8AG)、6-硫鸟嘌呤(6TG)、5-氟嘧啶(5FU)和5-碘尿嘧啶(5IU)等，其中6MP、5FU等已用于临床作为抗肿瘤药物，5IU等用作抗病毒药物；(2)嘌呤和嘧啶核苷酸合成过程中，作为提供—NH_2的重要前体物质如Gln等的类似物，例如重氮乙酰丝氨酸(azaserine)、6-重氮-5-氧正亮氨酸(6-diazo-5-oxo-L-norleucine)等，在结构上与Gln有相似之处，也能干扰核苷酸合成，可用作抗菌素，也有人企图用于抗肿瘤。还有次黄嘌呤与腺嘌呤合成过程中提供—NH_2的Asp之类似物N-羟-N甲酰甘氨酸(hadacidin，羽田杀菌素)也能抑制嘌呤核苷酸合成，就有可能被用作抗癌药物；(3)由于转一碳基(转甲酰基)是核苷酸合成途径中关键步骤，叶酸类似物氨基喋呤、对氨基苯磺酰胺能抑制菌体内和肿瘤细胞内的核苷酸合成，因而有可能被用于抗菌抗癌。它们的结构对比

如下：



9.3 DNA的复制

DNA是生物遗传信息的载体。在DNA中特定的核苷酸顺序决定了生物体的遗传特征，并通过自我复制，生长出完全相同的分子，从而将遗传信息从亲代传递到子代。

9.3.1 DNA 的半保留复制方式

Watson 和 Cricke 根据 DNA 是按照 G-C、A-T 碱基配对原则、由两条互补的多核苷酸链组成的双螺旋结构模型，又认为 DNA 的复制方式是一种半保留复制。因为 DNA 组成双螺旋结构的两条链是对应互补的，于是 DNA 的一条链的核苷酸排列顺序就可决定与它对应的另一条链的核苷酸排列顺序。换言之，DNA 分子的每一条链都包含有合成与其对应互补链的全部信息。他们推测：DNA 复制时先将双螺旋结构内配对碱基间氢键断裂，使两条链分开，然后每条链分别作为模板，按碱基配对原则通过酶促反应合成两条相应互补的 DNA 新链。这两个新形成的子代 DNA 分子的核苷酸顺序与亲代 DNA 完全相同，而每一个子代 DNA 分子中都有一条链来自亲代 DNA，也都有一条相应互补链是重新合成的。所以命名为半保留复制机制（见图 9-5）。

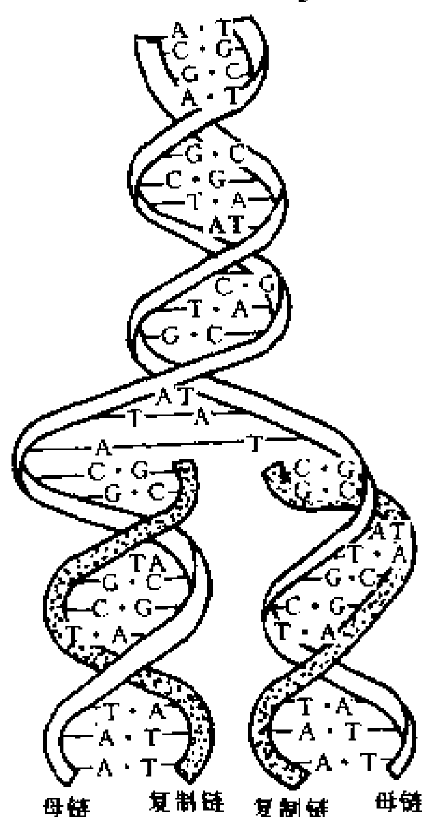


图 9-5 半保留复制示意

Meselson 和 Stahl 于 1958 年应用同位素 ^{15}N 为氮源培养基，率先进行大肠杆菌生长过程中 DNA 合成代谢跟踪实验，证实了 DNA 的半保留复制机制。他们先以 ^{15}N 为氮源（即含 NH_4Cl）的培养基长期培养大肠杆菌，另外让大肠杆菌在 ^{14}N（即含 $^{14}NH_4Cl$）氮源的普通培养基中生长作为对照，然后分别将这两种菌的 DNA 分离出来，各自进行氯化铯密度梯度离心时，因为用每分钟数万转高速长时间离心，会使离心管内的氯化铯溶液，在离心作用与扩散作用达到平衡时，形成了管底液面逐渐变小的密度梯度，于是溶液中的 DNA 就逐渐聚集在与氯

化铯密度相同的位置处形成区带。这样可以观察到密度较大的^{15}N-DNA区带近管底，而密度较小的^{14}N-DNA区带在管内近液面(见图9-6)。

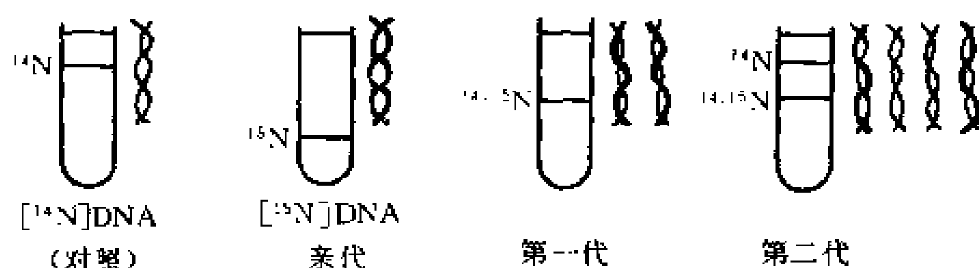


图9-6 半保留复制机制实验示意
(细线为^{14}N，粗线为^{15}N)

如果将大肠杆菌先在^{15}N氮源培养基中培养和繁殖亲代，然后再将细菌移入普通^{14}N氮源中培养，发现经过一代后所形成的子DNA，在离心时其区带位置处于前两者(^{14}N和^{15}N的)之间。这现象说明第一代子DNA是一链为^{14}N的和一链为^{15}N的“杂合”分子。将“杂合”分子加热处理后可分为^{14}N单链和^{15}N单链也能证实“杂合”分子是^{14}N(母链)和^{15}N复制链的双螺旋结构。当移入^{14}N普通培养基经第二代后，形成的DNA在离心时区带将分布在^{14}N和^{14}N-^{15}N两个位置上，实验又证明第二代DNA有一半分子为^{14}N的，还有一半为^{14}N-^{15}N杂合分子(见图9-6)。第三代后^{14}N的DNA成比例地增加。这种半保留复制方式也在植物、动物、病毒以及其它细菌等生物中研究后得到了实验证实。

DNA半保留复制机制是一个十分复杂的过程，不像上述所介绍的那样简单，它涉及多种蛋白质和酶的参与和协同作用的结果，该机制概括地说有解链引发、链合成与延伸和终止等几个环节。这种机制可能保证了生物的遗传特性稳定地传代。

9.3.2 DNA的解链和引发合成启动

具有双螺旋结构的DNA，在复制前必须先解开盘绕双链，提供两条单链作模板和复制的起始点，以便让脱氧核苷三磷酸能够分别

进入两链中进行配对合成。解链会形成叉式结构的复制叉，于是解开 DNA 的两条长链时双螺旋结构分子必须绕中心轴旋转一次方能把十对核苷酸解开，如果每秒钟解开 500 对核苷酸，DNA 分子就必须每秒钟旋转 50 次，这样旋转需要消耗大量自由能。因而 DNA 的解链需要两种蛋白的配合作用(参见图 9-7 所示)。一种是需要 ATP 参与的解螺旋酶，它能利用水解 ATP 的能量解开 DNA 双链。这类 DNA 解链蛋白大部分解链方向是 5′→3′，只有 rep 蛋白是 3′→5′，由于 DNA 的复制叉两条母链的方向相反，解链时常需要此两者分别在 DNA 的两条母链上协同作用。另一种参与解链的蛋白是单链结合蛋白(single-strand binding protein，SSB，又称解链蛋白或螺旋降稳蛋白)。它具有能与 DNA 单链强结合的特点而呈现正协同效应，尤其在原核细胞中是如此，即伴随一个这类分子的结合能迅速地扩大结合范围而使单链伸展。它在 DNA 复制中显出协同解螺旋酶解开 DNA 双链和保护单链免受核酸酶降解的功能。

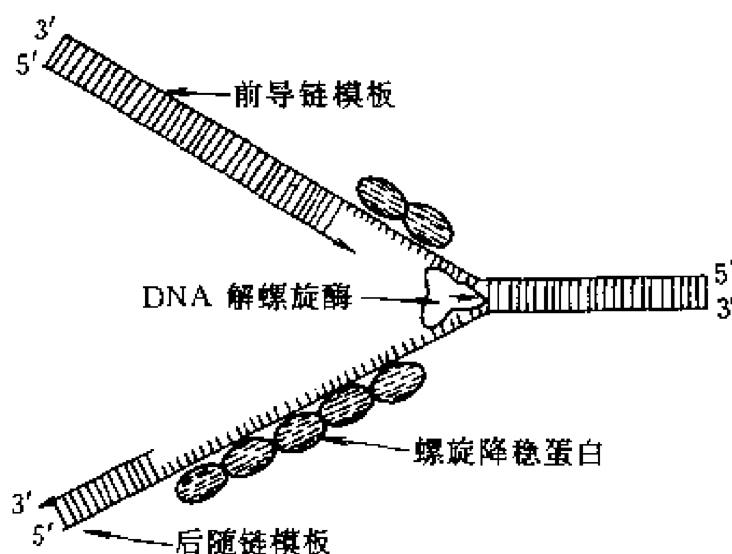


图 9-7　DNA 解链和复制启动

双螺旋结构的 DNA 往往进一步盘绕组成超螺旋(通常为负超螺旋或更高级结构)，当 DNA 分子局部解开时，将会使复制叉前方的螺旋进一步扭紧产生一种应力，此应力会反向作用阻碍继续解旋

和复制延伸，所以必须释放应力，估计可能有两种办法，一是上述所提及的让DNA分子绕着它的主轴进行旋转，将超螺旋一直传到末端(见图9-8示意)。但是环状DNA不可能用分子绕螺旋主轴旋转方式释放应力。另一种办法是在DNA分子双螺旋结构中一条链断裂成切口，让切口处单链自由旋转，由超螺旋变为松弛态(见图9-9示意)。拓扑异构酶是一类能可逆地催化DNA分子内磷酸二酯键断裂造成切口和重新接合的核酸酶，是复制和转录中极为重要的一类酶。它能促使线性DNA分子、环状DNA分子、单链或双链DNA分子进行拓扑变换，包括超螺旋态与松弛态间的变换，但不改变其化学组成与结构。通过拓扑异构酶的作用，可使复制延伸继续下去，还可使复制的两组DNA间不会再缠绕一起。

DNA双链的解开而形成模板只是为复制提供了可能的条件，但DNA在模板上合成还需要有引物，担负着DNA链合成的DNA聚合酶只能催化已有链的延长反应，它不能直接引发新链的合成。许多实验表明，DNA复制合成的引物是RNA，即DNA复制时先在复制叉单链模板上的起始部位，通过催化这种RNA引物合成的引物酶，直接使RNA链合成在DNA模板上(见图9-10)。这种引物酶实际上是RNA聚合酶。通常和其它一些蛋白质组成复合体(通称引发体)，参加DNA的复制。不同来源的引物酶在某些性质上往往有所不同，例如噬菌体M13的引物酶遇利福平(rifampicin)有抑制敏感性，因而在利福平存在下DNA合成的引发受阻。但大肠杆菌和噬菌体φ×174不会被利福平抑制。科学工作者利用了利福平对噬体M13引物酶的抑制实验证实了RNA引物是

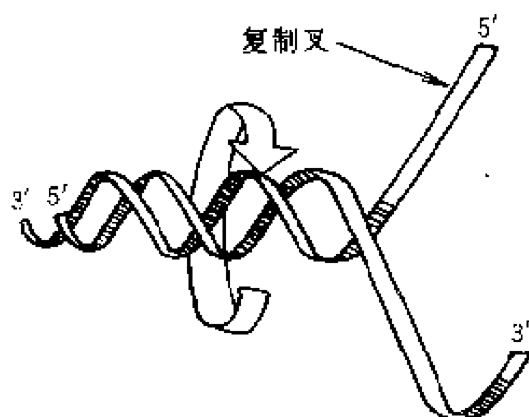


图9-8 DNA分子旋转释放超螺旋应力

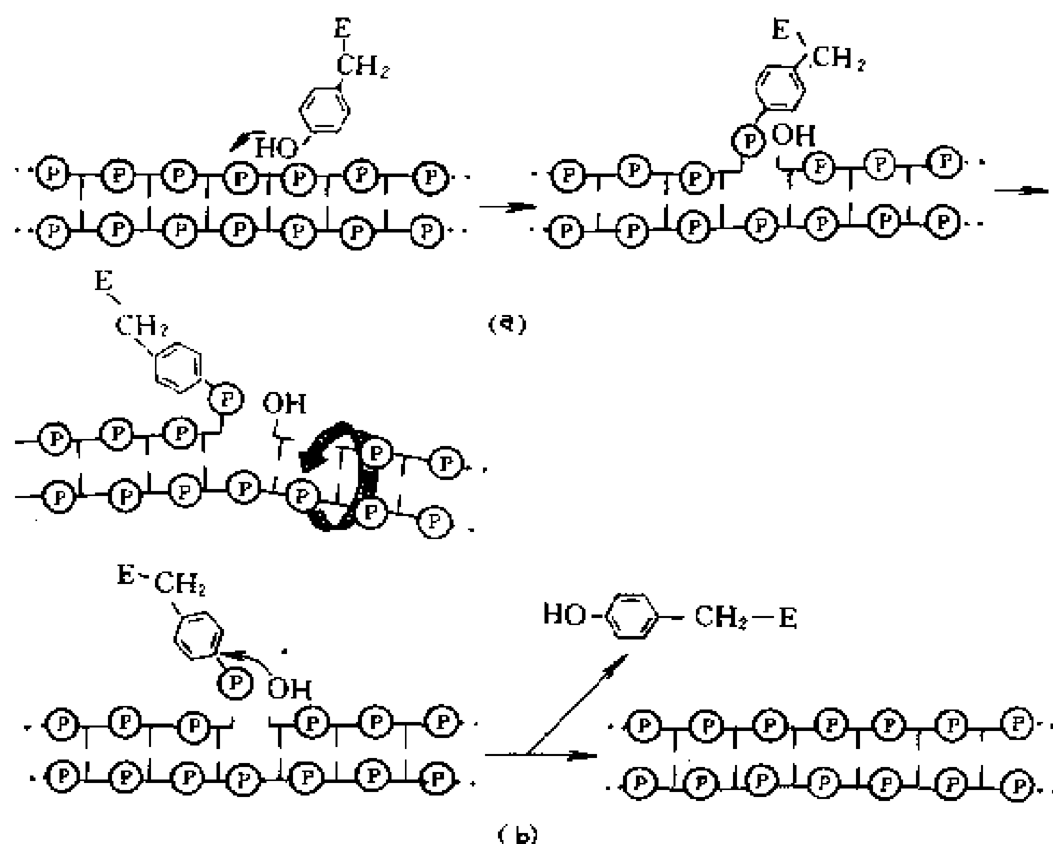


图 9-9 释放超螺旋应力的(a)切口方式和(b)重新接合过程

复制 DNA 所必需的。RNA 引物在原核细胞中链长约 50～100 个核苷酸，在真核生物中链长约 10 个核苷酸，它们都处在 DNA 片段的 5′-端。

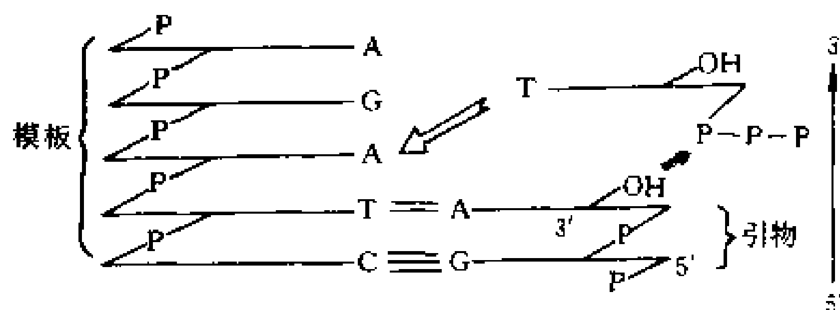


图 9-10 DNA 模板引物引发合成模型 DNA 聚合酶催化 5′→3′的聚合反应

9.3.3 脱氧核苷链的合成与延伸

(一)DNA 链合成过程中的聚合酶

体外实验揭示，在模板DNA、引物、四种脱氧核苷三磷酸底物和Mg^{2+}（或Mn^{2+}）存在的条件下，大肠杆菌DNA聚合酶能催化相应互补的脱氧核苷三磷酸，按照模板DNA碱基顺序加在引物的3′-OH末端，以及尔后逐个加在复制DNA链的3′-OH末端，促进DNA复制链延伸，合成方向都是5′→3′，同时从加入的脱氧核苷三磷酸上释放焦磷酸，并提供复制DNA所需的自由能。没有引物RNA的存在是不能进行DNA链的合成。担负催化DNA链合成的DNA聚合酶已发现广泛分布于细菌、动植物等各种生物中，它们的作用方式和要求基本相似。

在大肠杆菌中已先后发现有3种DNA聚合酶，分别命名为DNA聚合酶Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ（缩写为DPⅠ、DPⅡ和DPⅢ）。其中DPI相对分子质量109000是单肽链，有三方面活性：①在DNA模板指导下，能催化dNTP逐个在3′-OH端合成而加入DNA链；②在没有dNTP存在时，能催化从3′-OH端向5′-端方向水解DNA链而释放5′-单核苷酸，具有3′→5′外切酶活力，它能识别和除去不配对的错接核苷酸；③还有5′→3′外切酶活性，也以产生5′-单核苷酸为主。用枯草杆菌蛋白酶处理所得的相对分子质量为76000大片段，具有前两方面的酶活力，现已广泛用于DNA顺序分析，而所得的小片段具有5′→3′外切酶活力。DPⅡ的相对分子质量约120000，只具有DPⅠ前两方面的酶活力，但催化DNA合成的速率很低。从DPⅠ或DPⅡ缺失的变异株的实验发现体内仍能正常复制DNA，因此一般认为它们不是大肠杆菌内负责DNA复制的主要酶。DPⅢ活性实验发现它也具有DPⅠ的三方面酶活性，催化DNA聚合的合成转换率极高，达60000，而DPⅢ缺失的变异株不能成活，所以人们推测它很可能是大肠杆菌体内主要的DNA复制酶。

已知真核细胞中有DP_α、DP_β、DP_γ、DP_δ和线粒体DNA聚合酶（DP_m）等5种类型的DNA聚合酶。其中DP_α的活性最高，含量最多的可能是DNA复制的关键酶。DP_β在细胞内活力较恒定，估计有修复功能。DP_γ和DP_m很相似，可能在复制启动中起重要作用。它们

可以要求DNA链为引物,催化活力很高。但这4种DNA聚合酶都不具有外切酶活力,而DNA聚合酶δ却同时具有3′→5′的外切酶活性。

(二)不连续复制方式

因为DNA双链螺旋结构中两条母链是按互补原则反向平行的,DNA解链后所形成的复制叉中一条母链是5′-端走向3′-端,而另一条母链是3′-端走向5′-端。但至今发现的DNA聚合酶都以5′-脱氧核苷三磷酸为底物,只能催化DNA链从5′-端向3′-端方向合成。于是提出了DNA的两条模板链如何能同时进行复制的研究课题。

1968年冈崎等采用^3H脱氧胸腺嘧啶核苷三磷酸对噬菌体感染的大肠杆菌进行标记实验研究,并用密度梯度离心分离含标记的DNA,发现短时间内最初合成的是较短的DNA片段,分布于8S~10S范围内,长度约1000个核苷酸。如延长标记实验时间可得到长的DNA链。据此认为在DNA复制合成时至少有一条链是以不连续方式进行的。如以解链过程复制叉形成的前进方向为标准,一条模板链的取向是3′→5′,在这条链上,DNA合成则以5′→3′方向连续进行,此链称为前导链。另一条模板(5′→3′取向)链上DNA也是要以5′→3′方向合成,这就和复制叉形成的前进方向相反,此链称为后随链。随着复制叉形成的延伸,后随链上将合成很多不连续的DNA片段,人们将冈崎在短时间进行标记实验得到的DNA片段,称冈崎片段。这些片段可通过DNA连接酶的作用再连接成一条长的成熟的DNA链。所以至少对于后随链上合成DNA链是以不连续方式进行的,对于两条母链上DNA合成来说是一种不对称复制(见图9-11)。哺乳动物的DNA复制起始点可以有多个,和细菌相比,冈崎片段就会小而多个。

(三)DNA链的切口修复与DNA连接酶

对大肠杆菌的研究发现,DNA双链分子中有5′-磷酸与3′-OH切口的相邻片段可由DNA连接酶催化形成3′,5′-磷酸二酯键而连

接成长链(参见图9-12)。大肠杆菌DNA连接酶只能催化连接

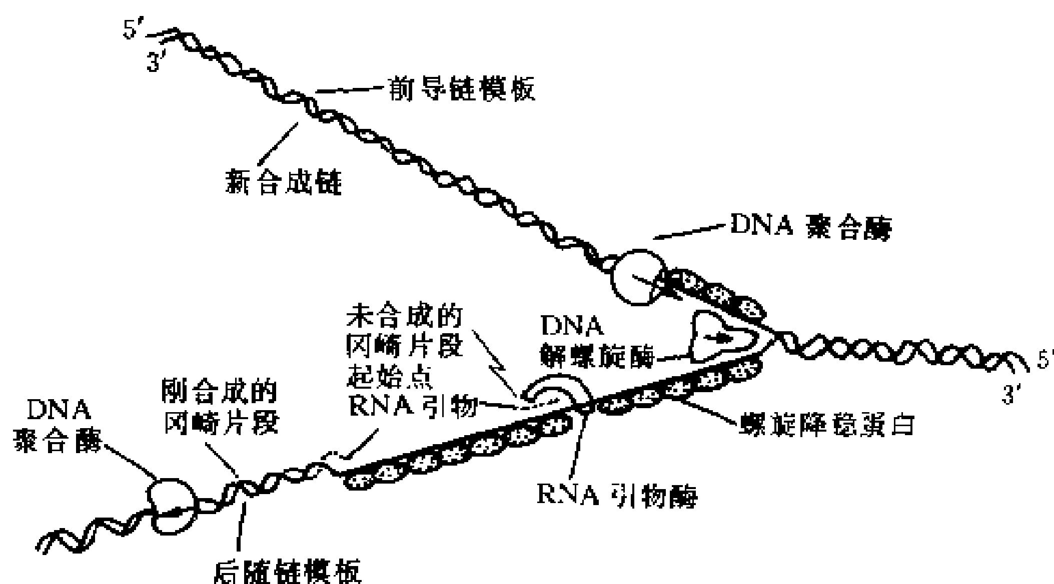


图 9-11 不对称复制示意

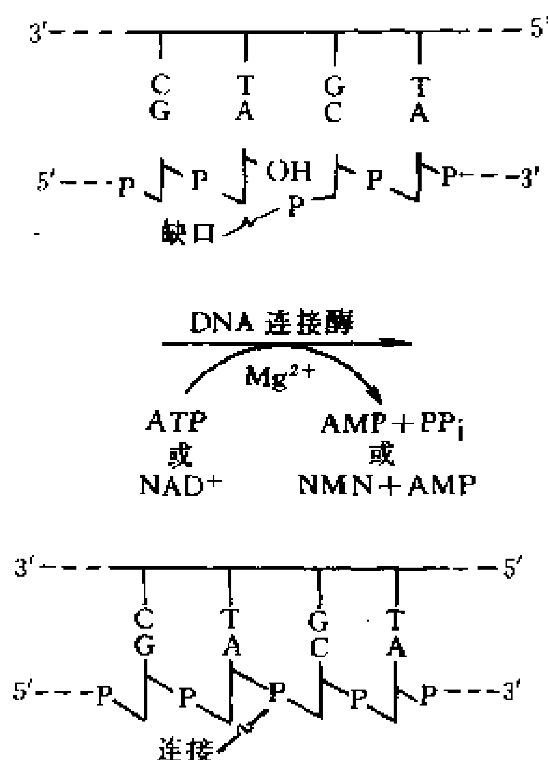


图 9-12 DNA 连接酶的作用示意

DNA-DNA、DNA-RNA 之间的交错切口,不能催化连接平头双链 DNA,催化反应所需的活化能是由 NAD^+ 参与反应提供的,细菌的 DNA 连接酶与此相似。还有噬菌体 T_4 诱导的大肠杆菌 DNA 连接酶可以催化连接 DNA-DNA、DNA-RNA 和 RNA-RNA 之间的交错缺口,也能催化连接平头双链 DNA,活化能由 ATP 参与的偶联反应所供给,动物细胞和噬菌体的 DNA 连接酶与此类型相似,现已广泛用于基因工程及分子生物学研究。

实验证明 DNA 连接酶对于 DNA 复制和修复等都非常重要，缺失 DNA 连接酶的突变株体内冈崎片段未能连接而增多。

(四)放射性标记自显影实验

DNA 螺旋双链在特定点解链后就开始形成复制叉，通常复制叉的形成是对称的，但 DNA 复制可能是单向方式，也可能是双向方式进行。为此采用了放射性标记自显影实验进行鉴定。在 DNA 开始复制时，先用低放射性的胸腺嘧啶核苷酸进行标记，数分钟后，再转移到高放射性的胸腺嘧啶核苷酸中继续标记，然后自显影。实验表明，大肠杆菌、枯草杆菌、高等真核细胞染色体 DNA 以及某些噬菌体(如 λ 与 T_4 等)的自显影图上，银颗粒的密度分布是中间低密度而两端高密度，这是双向复制的表征。真核细胞线粒体 DNA 以及某些噬菌体(如 P_2 等)的自显影图上，银颗粒密度分布是一端低而另一端高，说明它们的 DNA 复制都采取单向方式。

放射性标记自显影实验还可测定细胞 DNA 的复制速度，一般细菌的 DNA 复制速度要比真核细胞染色体的 DNA 复制速度快得多，前者约 30μm/min，后者约为 0.5～2μm 之间。

9.3.4 复制 DNA 的终止和 DNA 的损伤与修复

在合成完整的复制 DNA 链的终止阶段，当合成的 DNA 链延伸到不需要引物 RNA 时，核糖核酸酶 H(RNaseH)能识别并水解 DNA-RNA 杂合链中的 RNA 而发挥部分作用将它切除。DNA 聚合酶Ⅰ(DPⅠ)具有的 5′→3′外切酶活性也可能起着部分切除 RNA 的参与作用，并以 5′→3′聚合酶的活力催化复制的 DNA 片段延伸，填补了引物除去后空缺部位。最后通过 DNA 连接酶催化缺口中两相邻片段的 3′-OH 端与 5′-磷酸基连接起来，生成磷酸二酯键，从而完成 DNA 整链的复制任务。

当细胞 DNA 由于一些物理化学因素(如紫外线、电离辐射或化学诱变剂等)的作用而受到损伤时，在一定条件下细胞具有一系列机能去修复 DNA 的损伤。了解得较多的是因紫外光照射而引起 DNA 损伤的修复机制。

紫外线照射后,可促使DNA链中相邻两胸腺嘧啶核苷酸上嘧啶形成环状丁烷而产生胸腺嘧啶二聚体(如图9-13所示)。这种二聚体的形成,使DNA的复制和转录功能受到阻碍,从而造成生物的突变病症。生物体必须将其除去并进行DNA链修复。首先由UV-专一内切酶在近二聚体处切断损伤的DNA单链,然后DNA聚合酶在完整的DNA互补链为模板的指导下,在切口处进行局部的修复合成与延伸,同时5′→3′外切酶(如DPⅠ或DPⅢ)催化切去含嘧啶二聚体的寡核苷酸片段,最后由DNA连接酶催化将新合成的DNA链与原来的DNA链连接修复。

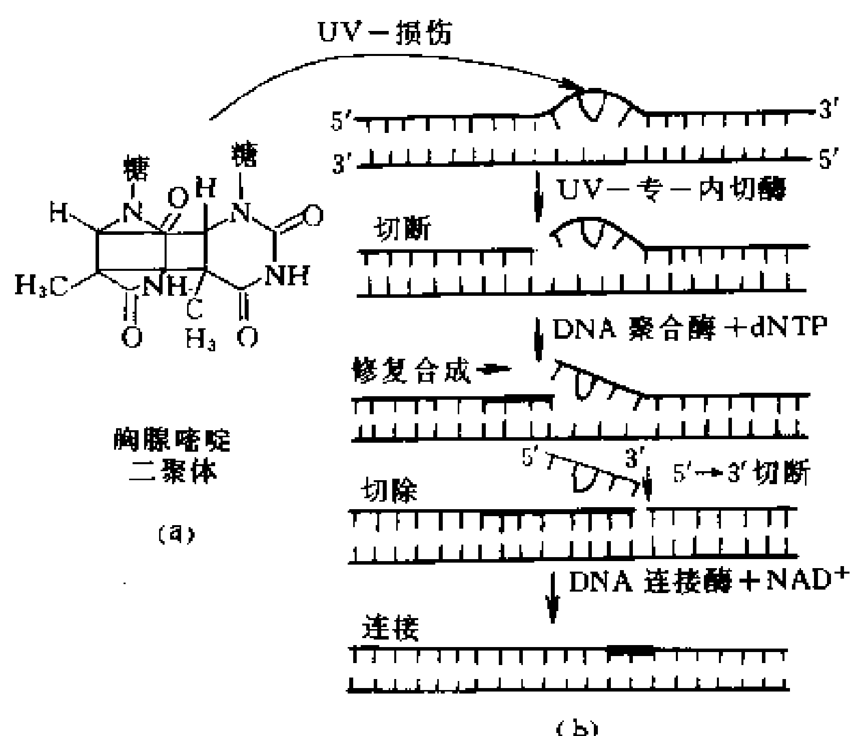


图9-13　紫外光损伤(a)及(b)DNA修复过程

9.4　RNA的生物合成

9.4.1　DNA指导下的RNA合成

由DNA指导下的RNA聚合酶(DNA-directed RNA Poly-

merase,缩记 DDRP)催化合成 RNA,是在 4 种核苷三磷酸(ATP、CTP、GTP 和 UTP)与 Mg^{2+} 存在的条件下,以 DNA 为模板,按碱基配对原则进行聚合完成的,这样合成的 RNA 是与 DNA 模板对应互补的,如图 9-14 所示,然催化 5′→3′取向的 RNA 合成是不需要引物。人们认为这是一种转录过程。

图 9-14　DNA 指导下的 RNA 合成(转录)

(一)转录作用中的 RNA 聚合酶

在原核生物中只有一种 DDRP,能催化 mRNA、tRNA 和 rRNA3 种 RNA 的合成。只要有适当的 DNA 模板存在,RNA 的合成也可在试管内进行,大肠杆菌的 DDRP 是由 5 种亚基蛋白质 $\alpha_2\beta\beta'\sigma\omega$ 组成的全酶,其中 $\alpha_2\beta\beta'\omega$ 5 个亚基的聚集具有和底物结合以及催化 RNA 合成的活性,人们将它称作核心酶。亚基 σ 能在 DNA 模板上合成 RNA 时识别起始位点,使核心酶结合在起始位点上,形成核心酶-DNA 复合物,从而催化发生起始的核苷酸间磷酸二酯键反应,故称为 σ 起始因子,它与核心酶结合较松,可经磷酸纤维素层析分离开。含类似的 DDRP 之细菌还有枯草杆菌、假单孢杆菌等。

真核细胞中转录作用的 RNA 聚合酶有多种类型,细胞核内已发现的有 DDRPⅠ、DDRPⅡ和 DDRPⅢ等 3 种。DDRPⅠ分布于细胞核仁中,负责催化核糖体(rRNA)的转录,DDRPⅡ和 DDRPⅢ分布在核质中,分别催化 mRNA 和 tRNA 以及 5SrRNA 的转录。它们的

相对分子质量约为50～70万。

(二)转录启动

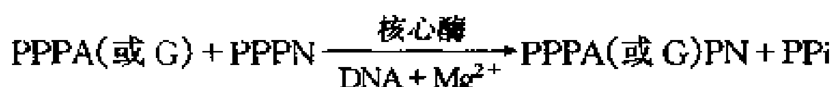
研究发现,DDRP的核心酶能与模板DNA结合,并对所有螺旋区有大致相同的亲和力,如核心酶与σ起始因子结合,就呈现出全酶对DNA模板转录起始位点结合的专一选择性。人们将σ选择的全酶起始结合位点称为启动子,并认为σ的结合能引起核心酶有专一选择性,是由于核心酶在σ作用下改变了构象而适应与启动子结合的原因。

根据现有的认识,认为转录启动是核心酶先和σ结合成全酶,于是识别出起始位点而与模板DNA上启动子结合形成不稳定的全酶-DNA复合物,然后沿着DNA链滑动而进入富含A.T顺序的DNA与酶紧密结合区,使该区双螺旋作有限(约1个螺旋圈)瞬时的解链,伴随核心酶进入引发点的同时,引入第1个核苷三磷酸(通常是PPPG或PPPA)开始催化转录。所以启动子可能含有起始信号识别区、酶紧密结合区和转录起始区3个部位。

由于全酶能专一地和启动子区段紧密结合,因此,可以通过特制滤膜将全酶-DNA复合物分离出来,再用DNase进行水解处理,就可得到全酶保护下的启动子片段,不同来源的这种片段含有41～44个核苷酸,其中都有富含A.T的与酶紧密结合区,例如原核生物共有特征顺序为TATAAT,真核生物共有特征顺序为ATA。

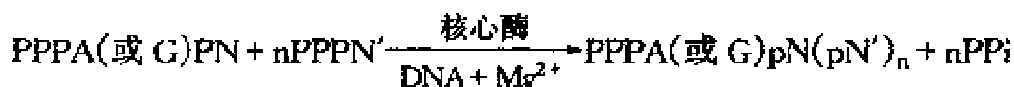
(三)转录延伸

不需引物由DDRP催化的转录,促使RNA合成的起始一步完成。与此同时,σ就从全酶-DNA复合物上脱落,引起核心酶的构象改变,核心酶失去与DNA结合的专一性而易于滑动。核心酶沿DNA链滑动,根据碱基配对原则引入转录系统的第2个核苷三磷酸,在核心酶催化下与第一个核苷三磷酸形成第一个3′→5′的磷酸二酯键,即



$$\text{PPPA(或 G)} + \text{PPPN} \xrightarrow[\text{DNA}+\text{Mg}^{2+}]{\text{核心酶}} \text{PPPA(或 G)PN} + \text{PPi}$$

随着核心酶的滑动，转录进入延伸阶段，即



$$\text{PPPA(或 G)PN} + n\text{PPPN}' \xrightarrow[\text{DNA}+\text{Mg}^{2+}]{\text{核心酶}} \text{PPPA(或 G)pN(pN}')_n + n\text{PPi}$$

也就是说，第三、四、……个核苷酸依次转录，使 RNA 链逐渐延长。从全酶-DNA 复合物上脱落后的 σ 因子又可与新的核心酶结合，循环发挥其识别模板上起始位点的作用。

利福霉素（rifamycin）能抑制原核生物的转录启动，利链霉素（streptolydigin）、放射菌素 D 等能抑制转录的延伸。

（四）转录终止与转录后加工

当 RNA 转录到一定长度时，DNA 模板链上"终止子"的核苷酸终止信号序列由 DDRP 所识别，或者有的由与 RNA 聚合酶结合的特殊蛋白质 ρ 因子所识别。此时转录停止，并释放产物 RNA。所以转录终止含三步过程，即合成 RNA 链延伸的终止、新生 RNA 链的释放和核心酶脱模。

已测定的部分 DNA 模板转录终止区域结构表明，有的在接近终点部位有一个二元对称结构，它可以转变为"十字结构而发出延伸终止信号(参见图 9-15)。让 DDRP 识别后，相应地由"延伸结构"变为"终止构象"，从而由模板上脱落。还有的在富含 G、C 的区段后继以几个尿核苷酸残基，并以腺苷酸残基结尾，这类区段也可发出被 DDRP 识别的终止信号。

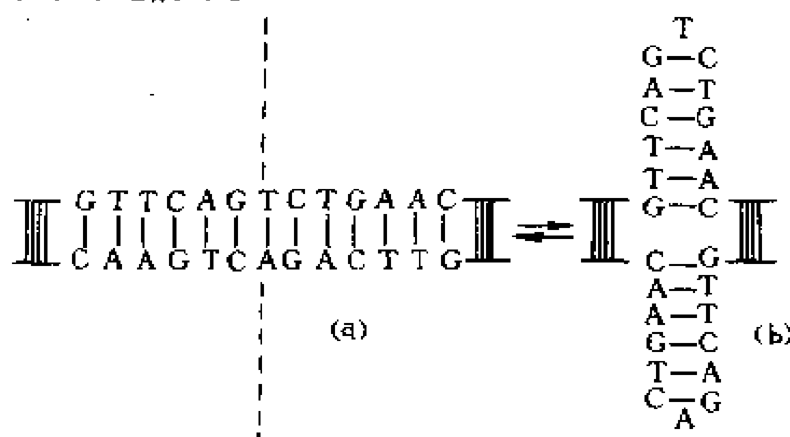


图 9-15 一些 DNA 模板转录终止区域的一级结构二元对称(a)和十字结构(b)

关于需要 ρ 因子参与终止转录的机制是:它能和 RNA 聚合酶结合,并识别 DNA 模板上富含 A、U 的终止信号序列区

—UUAAUUUGACUAAUUCUCAUU—

ρ 与 RNA 聚合酶结合并非起着酶效果的成分,只是发挥其终止转录的作用,它具有水解 ATP 等的 NTPase 活力,水解释放的能量供其沿合成延伸的 RNA 链转移,抵达终止区与 RNA 聚合酶会集而结合,然后释放新生的 RNA 链,除了原核生物的 mRNA 外,新生的 RNA 一般都是未成熟的 RNA 前体,需要进行转录后加工才变为成熟的 RNA。

新生 mRNA 的转录后加工对于原核生物来说,一般是不需要的,它的半寿期在几分钟以下,于是可在转录同时就开始了翻译。对于真核生物而言,各种蛋白质基因先独立地转录成相应的 mRNA 前体,称作核不均一 RNA(hnRNA,20S~100S,主要的是 30S~40S),然后必须进行后加工才能变为成熟的 mRNA。mRNA 的转录后加工过程是:剪接去除内含子和非编码区等非结构信息部分,而由一系列酶参与下在 5′-末端形成 $m^5G^{5'}$pppNmpNp 特殊结构,并由 RNA 末端腺苷酸转移酶催化下,在 hn RNA 或 mRNA 的 3′-末端连接多聚腺苷酸(polyA)。

经研究发现,在各类细菌细胞中编码 rRNA 的基因是排列在一起构成一个转录单位。大肠杆菌转录所得的新生 rRNA 是 30S 的前体,尚含 16S、23S 和 5S 的前体,还有 tRNA 的前体。16S 和 23S 中都有较多的甲基化修饰成分,其中 16S rRNA 的特征成分似乎是 m^4Gm,而 5S 无修饰成分。真核生物中哺乳动物的新生 rRNA 前体有 45S,还可以有 18S、28S 和 5S 的前体,且有独特的 5.8S RNA。在大肠杆菌中 30S 转录后加工是由 RNaseⅢ和 RNaseE 参加先将其切成一定长度而形成 16S、23S 和 5S 的前体以及 tRNA 前体。再由 RNaseM 催化成熟(真核生物中有相类似之处),并在转录过程中进行甲基化修饰,还进行了插入顺序的切除。

tRNA 的种类颇多,原核细胞中有 30~40 种,真核生物中有 50

种以上，而且 tRNA 的基因往往和 rRNA 的基因连接在一起，其转录后加工一般是紧随转录之后，需要多种酶的协同作用。转录后加工过程较复杂，5′-端要由 RNaseP(一种包含 2/3RNA 的 5′-内切核酸酶)催化修剪才会成熟。3′-端在外切修饰酶 RNaseD 专一地从 3′-端逐个切下附加顺序后才能成熟。还要依靠由内切核酸酶、激酶、2′，3′-环磷酸-3′-磷酸单酯酶、连接酶和磷酸单酯酶等组成的极复杂酶系催化，将 tRNA 前体中的插入顺序除去而进行剪接方能完成加工过程。

tRNA 还必须有 3′-CCA-OH 末端才有活性，如果缺少这一顺序则会在转录后加工中由 tRNA 核苷酰转移酶催化下逐个添加完成。此外，转录后加工形成成熟的 tRNA 分子还需在修饰酶催化下装配许多修饰成分。由于转录后加工是一复杂过程，因此对转录后加工的研究还不很清楚。

(五)转录的调控

在研究和解释原核生物的转录调控中提出了操纵子学说[图 9-16(a)]。操纵子是由结构基因、操纵基因和启动基因等组成的转录单位之通称，是转录调控的结构基础。结构基因含有关蛋白质的结构密码，在转录和翻译中能决定蛋白质的结构和性质。操纵基因具有“开关”功能，当“开”时，附在启动基因上的 DDRP 就能通过它的控制，沿着结构基因滑动，并以结构基因为模板进行转录，合成相应的 mRNA，然后再通过翻译合成相应的蛋白质。当操纵基因“关”时，DDRP 的移动就受阻遏，结构基因无呈现其模板作用的可能，于是不能合成相应的蛋白质。

操纵基因又受调节基因控制，因为调节基因密码所合成的调节蛋白多数表现出阻遏作用，故称为阻遏蛋白。它在某些转录系统中能直接和操纵基因结合，使之关闭，阻遏了转录的进行。还有一些系统中，阻遏蛋白只能与称作辅阻遏效应物形成络合物时，才能对操纵基因起阻遏作用。由于原核生物中的转录和翻译直接偶联在一起，因此，转录的调控是基因表达中的关键。

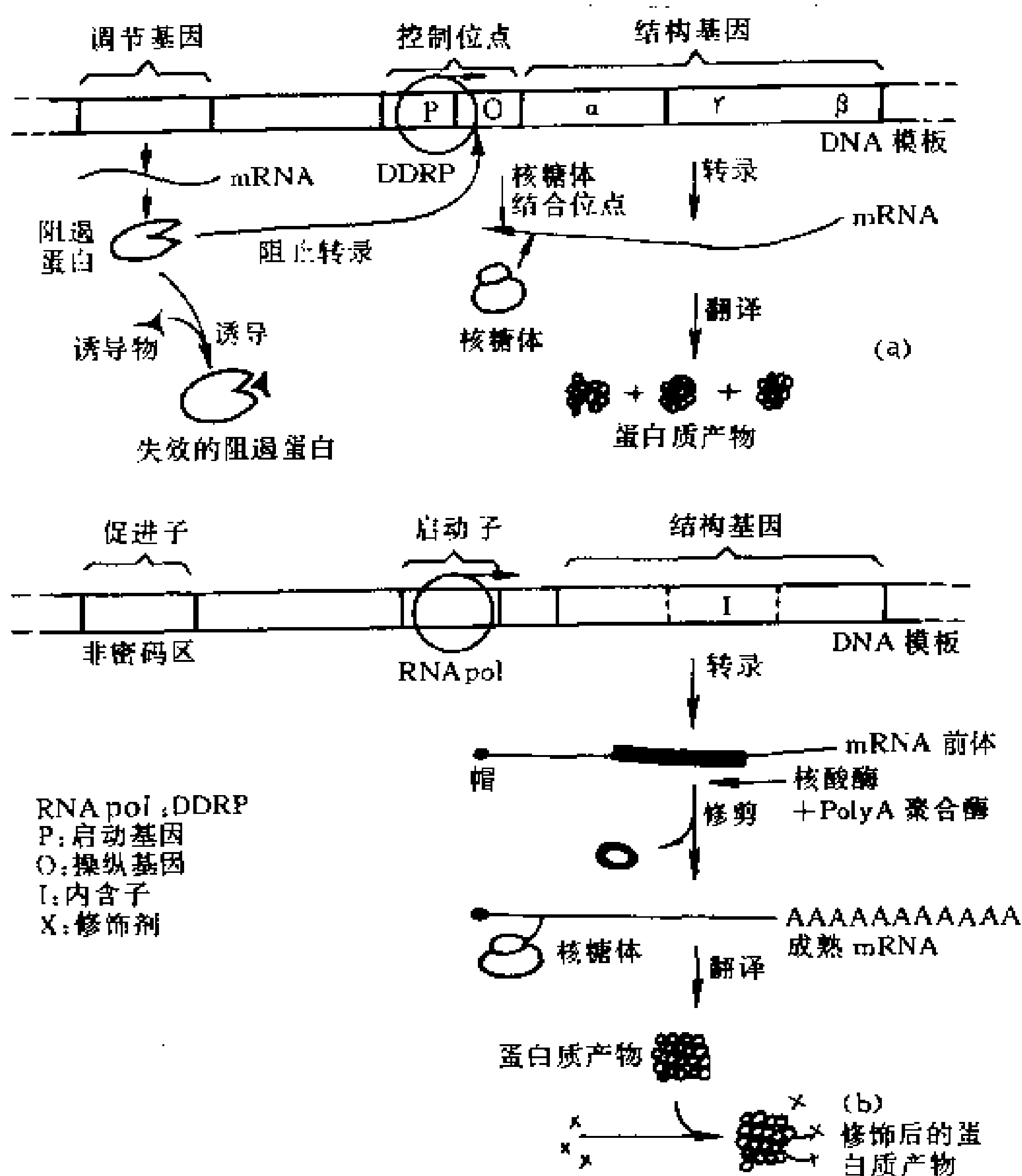


图 9-16　基因表达调控机制

(a)原核生物的操纵子学说；(b)真核生物调控机制解释

研究发现，某些酶在通常情况下不会合成或很少合成，当加入诱导物后，属于别构蛋白的阻遏蛋白就和诱导物结合而改变了构象，从而失去了和操纵基因结合的功能，于是操纵基因“开放”而使转录得以进行，某些酶就能大量合成。这种转录的调控方式称为诱导。

阻遏蛋白的阻遏转录有两种类型。一种是阻遏蛋白本身在正常

情况下没有和操纵基因结合的能力而不起阻遏作用,因而某些酶在通常情况下能以一定速度正常地合成,然而当合成的这些酶所作用的产物积累一定浓度后,就明显地成为阻遏蛋白的效应物而结合,促使阻遏蛋白产生别构效应,变成能和操纵基因结合,从而使酶的合成受阻。人们称这类机制为“尾产物阻遏”,或称为“反馈阻遏”。

另一种类型是分解代谢产物阻遏。研究发现,环化腺苷酸(cAMP)是cAMP受体蛋白(CAP)活化的必要因子,当CAP被cAMP活化后一起和模板DNA的特定位点结合时,DDRP才能附着在启动基因上开始催化转录。但细胞生长利用的碳源(例如葡萄糖等)分解代谢产物易影响cAMP的合成与分解,随着这种代谢产物浓度的增加会降低cAMP的浓度,并限制其与CAP的结合,则呈现出阻遏转录某些酶的作用。倘若加入cAMP可减轻或解除这种阻遏,也可反证有分解代谢产物阻遏的存在。

真核细胞的转录调控机制较复杂,例如它没有类似的操纵基因,影响DDRP与模板结合的因素有所不同,如促进子,它是一种非密码的无组蛋白结合的DNA顺序,估计其功能是吸引DDRP与模板结合而进入密码区,所以当DDRP一旦与模板DNA结合即可开始转录。现在对真核生物的转录调控机构的了解还是不太清楚。

9.4.2 RNA指导下的RNA复制

(一)RNA病毒的RNA复制

RNA指导的RNA聚合酶反应是在4种核苷三磷酸和Mg^{2+}存在的条件下,以RNA为模板指导RNA聚合酶(RNA directed RNA Polymerase,RDRP,又称RNA复制酶)催化与模板完全对应的RNA合成,复制取向仍是5′→3′,不需要引物。这类复制一般是RNA病毒的RNA复制,RDRP有较高专一性,能识别病毒自身的RNA,不对宿主及其它与病毒无关的RNA产生作用。

以二十面体包含单链mRNA的脊髓灰质炎病毒(Poliovirus)为例,病毒RNA进入寄主细胞后会利用寄主的核糖体系统翻译依它密码的衣壳蛋白与RDRP,并以自身mRNA为模板经RDRP催化合

成对应互补的 RNA,随后又可将对应互补的 RNA 再作为模板合成更多的 mRNA,由衣壳蛋白包裹便形成许多新病毒粒子。进一步研究发现,刚翻译得到的是一个大得多的肽链,它包含多于 2000 个氨基酸残基,再由寄主蛋白酶切断成 4 种衣壳蛋白和 1 种 RNA 复制酶以及 2 种未知功能的蛋白质。

如以水泡性口膜炎病毒(VSV)为例,这种病毒粒子包含单股对应互补的 RNA,还含 2 种具有 RNA 复制酶活力的蛋白质与其它 3 种蛋白质。在感染寄主后,对应互补的 RNA 进入细胞由 RNA 复制酶催化复制出 mRNA,通过 mRNA 即可翻译合成上述 5 种蛋白质,又可作为合成新病毒粒子所需对应互补 RNA 的模板,借此机制病毒得以繁殖。

再以呼肠孤病毒(Reovirus)为例,这是一种含 mRNA 和对应互补 RNA 组成的双链 RNA(简记 ± RNA)病毒。病毒粒子的核心含有与 10 种蛋白质结合的 10 种不同的双链 RNA(即 ± RNA)。该病毒感染寄主后,在脱掉衣壳的同时,含于核心中复制酶被活化。RNA 复制酶便在原来的(±)RNA 为模板上进行不对称和保留性的复制,仅合成了 mRNA。合成的 mRNA 在酶的作用下戴帽后穿出核心通道,10 种 mRNA 再被翻译成 10 种蛋白质,这些蛋白质又和 10 种 mRNA 结合形成病毒粒子前体核心,最后在前体核心上合成对应互补的 RNA。

(二)病毒 Q_β(Q_β Phage)的研究与 RNA 重组技术

对于 Q_β 病毒的研究,发现它类似于脊髓灰质炎病毒的 RNA 复制方式。已知它是直径约 20nm 的非常简单的二十面体病毒。Q_β 的 RNA 含 4220 个核苷酸,具有高度有序的二级结构,还含 4 种蛋白质的基团,即衣壳蛋白、成熟蛋白、裂解蛋白和 RNA 复制酶的一个亚基,裂解蛋白的基因和衣壳蛋白是与复制酶亚基的基因部分重叠。分子内有一 RNA 复制酶的结合位点,在分子的 3′端有一富含胞嘧啶的复制起始区段。

完整的活性 Q_β 复制酶应由 4 个亚基结合一起构成的,但

Q_βRNA 仅密码 RNA 复制酶 1 个亚基，其它 3 个亚基由寄主细胞供给，其中两个是蛋白质合成的延伸因子(EFTu 和 EFTs)，另一个是核糖体 30S 的一个组成成分。Q_β 感染寄主后，其 RNA 就作为 mRNA 直接与寄主细胞中的核糖体结合，翻译出它所编码的蛋白质和复制酶的那个亚基，随即和其它 3 个亚基结合，完成活性 Q_β RNA 复制酶的构建。

Q_β 复制酶先以其 mRNA 为模板，合成对应互补的 RNA，然后生成的对应互补的 RNA 和原模板 mRNA 又都能作为模板再被复制，这样的每一复制循环就可使模板数量加倍地增加，而且在每一个模板上可同时进行几个分子的复制合成，因此复制成的 RNA 按指数增长。由于该复制酶与对应互补 RNA 的亲和力比 mRNA 的大，所以合成的 mRNA 多。

科技工作者发现，Q_β RNA 的复制效率极高，在 10min 内，RNA 的量可增加 10 万倍，而且 Q_β 复制既稳定又易制备。于是着手开拓 Q_β 复制系统的研究和创建重组 RNA 技术的工作，以便大量制备 mRNA。由于 Q_β 复制酶对 Q_β RNA 的复制呈现高度专一性，探索者们只能转为对获得的一种 MDV-1(midivariant)的变异分子着手，该变异分子有 221 个核苷酸，其中第 81 到 126 和第 187 到 221 的两区段核酸顺序，几乎分别与 Q_β RNA 对应互补 RNA 链中 84 到 129 和 4186 到 4220 两段的完全相同，而且可以形成多发夹状的二级结构，适合于作 Q_β 复制酶的底物，后又经适当改造而成为外源 RNA 重组的理想载体。这种重组 RNA 技术的探索已取得进展，这将对基因工程和分子生物学的研究作出重大贡献。

(三)RNA 复制的调控

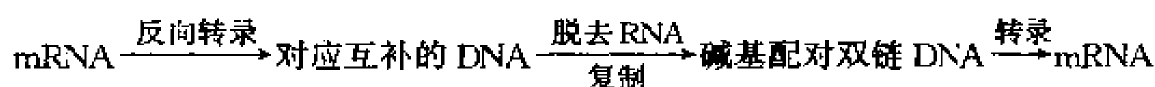
以 Q_β 复制为例概述 RNA 复制的调控机制。当 Q_β 的 RNA 进入寄主细胞内，先作为对应互补 RNA 合成的模板，后成为病毒蛋白的翻译信使。在感染早期，Q_β RNA 作为模板，在沿 RNA 按 $3'\rightarrow5'$ 方向推进的复制酶催化下，大量合成对应互补的 RNA，此时 Q_β RNA 复制酶强烈地抑制着 mRNA 和核糖体的结合。当复制了足够量的

对应互补 RNA 后，复制酶的上述抑制效应才随着减轻，核糖体就能和 mRNA 结合，并沿着 mRNA 由 5'→3'方向运动，同时进行蛋白质的合成，由于核糖体和衣壳蛋白的翻译起始位点的作用远比其它位点强，所以合成的蛋白质中主要翻译产物是衣壳蛋白。在感染后期，衣壳蛋白能和复制酶基因的翻译起始位点结合，阻止了复制酶的催化合成，而增加了衣壳蛋白的翻译，从而形成大量新的病毒粒子。

9.4.3 反向转录

反向转录意指由 RNA 指导的 DNA 聚合酶（即称反向转录酶）催化下合成 DNA，然后再转录产生 RNA 的机制。这属于反转病毒类（Retroviruses）所特有的繁殖历程。Temin 为此提出过一种“前病毒学说”，认为 RNA 病毒在复制和致癌过程中 RNA 先要经过反向转录形成 DNA，然后在寄主细胞 DNA 中作为前病毒潜伏下来，成为一个 DNA 前病毒阶段，随着寄主细胞增殖和传代，在某特定条件下再重新转录为 RNA，生成新的 RNA 病毒。

催化反向转录的反向转录酶，即 RNA 指导下的 RNA 聚合酶（RNA-directed DNA Polymerase，缩记为 RDDP）可从鸟髓母细胞瘤病毒（AMV）等中分离获得。它所催化合成反应要求模板 RNA、引物、4 种脱氧核苷三磷酸以及适当浓度的 Mg^{2+}（或 Mn^{2+}）存在。但该酶对模板 RNA 的专一性要求并不高。AMV 的反向转录酶可利用的模板有鼠白血病病毒（MLV）的 RNA、带有 PolyA 的 mRNA 和人工合成的聚核苷酸 PolyA·$dT_{12\text{-}18}$与 Poly C·dG_{12}等。不过它必须要有与模板互补并带 3' - OH 与至少含 4 个以上核苷酸的引物，如 Oligo dN 或 Oligo N。反向转录酶不仅具有以 RNA 为模板聚合对应互补 DNA 的活性，也有似 RNaseH 能选择性地除去 DNA-RNA 中 RNA 的活性，同时还有以 DNA 为模板按碱基配对原则合成另一 DNA 的活性，催化形成双链 DNA，最后又催化转录合成 mRNA，即



$$\text{mRNA} \xrightarrow{\text{反向转录}} \text{对应互补的 DNA} \xrightarrow[\text{复制}]{\text{脱去 RNA}} \text{碱基配对双链 DNA} \xrightarrow{\text{转录}} \text{mRNA}$$

反向转录反应示意于图 9-17。

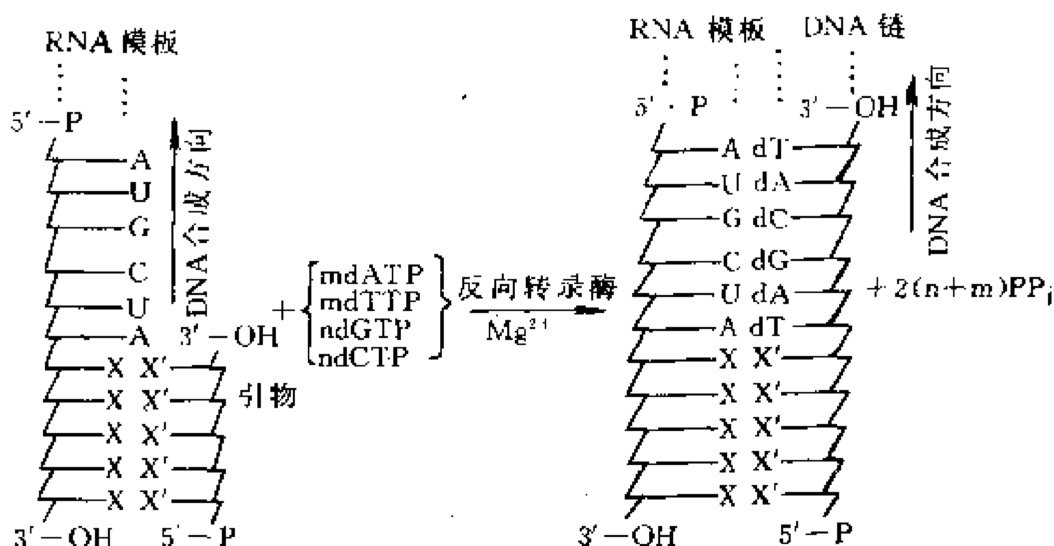


图 9-17 反向转录反应示意

(xx′表示相互结合的碱基对)

鸟肉瘤病毒是在感染过程中利用寄主的 tRNA(trp tRNA),通过非共价键与病毒 RNA 结合,这种碱基配对的 tRNA 上 3′-OH 便可当作引物进行引发反向转录合成。

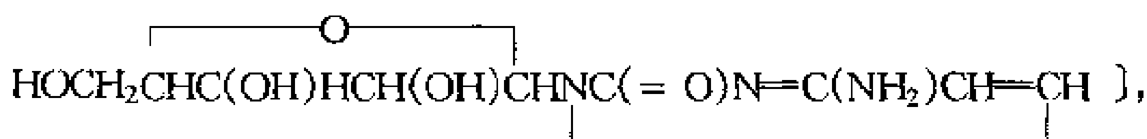
反向转录酶(reversetranscrip tase)也存在于正常细胞和胚胎细胞内,对细胞的发育和分化可能起着一定的作用。该酶近来已广泛利用于分子生物学研究和基因工程,例如制备 cDNA 等。

对肿瘤病毒的致癌机制和反向转录酶催化作用的研究,人们企图寻找反向转录酶的专一抑制剂以防治肿瘤疾病。

9.4.4 核酸生物合成抑制剂

研究核酸生物合成机制时常使用降低酶催化活性的各种核酸生物合成抑制剂,它们大体可归纳为三种类型。

(一)9.2.6 所提及的这类能抑制有关酶催化活性的物质,它们是人工合成的碱基或核苷类似物等核苷酸生物合成抑制剂。关于结构上类似胞嘧啶核苷(只是在核糖 2 号碳位上-OH 与-H 空间换了位)的阿胞苷〔1-β-D-阿拉伯呋喃糖-胞苷,分子式为



也可用作抑制剂，它能抑制胞嘧啶核苷二磷酸还原成脱氧胞嘧啶二磷酸，并直接抑制 DNA 指导下 DNA 聚合酶(DNA directed DNA Polymerase DDDP)的催化活性，现已应用为抗肿瘤药物。随着研究的进一步深入，科技工作者又试制了更有效的抗癌药物环胞苷。

(二)嵌合模板 DNA 或烷基化模板链上一些碱基的抑制剂，例如放线菌素 D，它含吩噁嗪酮稠环和两个五肽环(图 9-18)，能嵌入相邻的两对 dG 与 dC 间，与 DNA 形成非共价键复合物，在低浓度时可选择性地抑制 DDRP 催化 RNA 的延伸，高浓度时能抑制转录起始与 DNA 复制。还有阿霉素(adriamycin)、光神霉素(mithramycin)、色霉素(chromomycin)等都能与模板以嵌合形式结合而起抑制剂作用，因此已被用作抗癌药物。

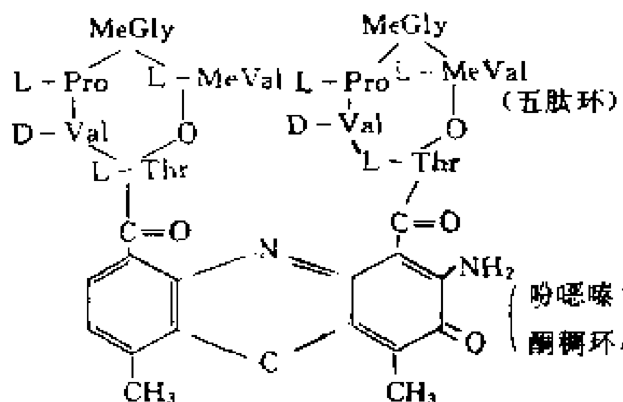


图 9-18 放线菌素 D

有关能对模板链上的鸟嘌呤碱基第 7 位 N，腺嘌呤第 1 位和第 7 位 N，胞嘧啶第 1 位 N 等进行烷基化的抑制剂，它们都带有 1 个或多个活性烷基，例如氮芥、氮丙啶等也可称为烷化剂。它们对 DNA 链上一些碱基进行烷基化后，会抑制 DNA 的复制，但一般毒性较大，有的甚至有致癌活性，不过也有一些可作为抗肿瘤(或癌)的药

物，如环磷酰胺[$(ClCH_2CH_2)_2NP(=O)NHCH_2CH_2CH_2O$]对正常细胞几乎无毒性，当进入肿瘤细胞后，会被迅速水解产生氮芥而对DNA进行烷基化。丝裂霉素C(mitomycin C)含有氮丙烷、氨基甲酸酯等能使DNA烷化而抑制DNA的复制，所以它也已用作抗癌的抗菌素。

(三)与RNA聚合酶结合的抑制剂，对于原核生物DDRP产生抑制效应的有利福霉素及其衍生物利福平、曲张链菌素和利链菌素，它们能与DDRP的β亚基结合而起抑制作用，不过它们一般对真核生物的DDRP没有抑制活性。然而α-鹅膏蕈碱具有完全抑制真核生物DDRPⅡ和Ⅲ进行转录的性能，但不抑制细菌、线粒体等的DDRP催化活性。

9.5 蛋白质的生物合成

自然界中蛋白质的种类成千上万，它们都有各自特征的结构，千差万别地组成各种器官的成分而呈现各自特有的功能，这说明蛋白质的生物合成必然是严格按照各种特定的指令进行的。特定的指令来源于特有的密码在DNA核苷酸顺序结构中的遗传信息。

9.5.1 遗传密码

蛋白质合成的遗传密码包含于DNA的碱基顺序之中，DNA先将它的密码遗传信息通过转录传给mRNA，随后再通过翻译将密码在mRNA核苷酸顺序中的信息转换成相应的氨基酸顺序合成蛋白质。

天然的蛋白质都由20种左右的氨基酸组成，而DNA或mRNA中仅有4种成分的核苷酸，于是根据统计规律推算，DNA或mRNA链上至少要由三个相邻核苷酸组成的遗传密码才能成为决定一种氨基酸的信息。这样，可能形成的编码数是 $4^3=64$，足以满足20种氨基酸编码的需要。现代生物化学和遗传学的研究，通过大量实验

证明,自然界确定以三个连续的核苷酸组成一个所谓密码子来表达一种氨基酸的编码信息。这种密码子也称为三联(体)密码。表 9-1 是通过实验检测而编制出来的三联体密码的遗传信息。

表 9-1 遗传密码释译表

5′末端碱基	中间碱基				3′末端碱基
	U	C	A	G	
U	Phe (UUU)	Ser (UCU)	Tyr (UAU)	Cys (UGU)	U
	Phe (UUC)	Ser (UCC)	Tyr (UAC)	Cys (UGC)	C
	Leu (UUA)	Ser (UCA)	终止 (UAA)	终止 (UGA)	A
	Leu (UUG)	Ser (UCG)	终止 (UAG)	Trp (UGG)	G
C	Leu (CUU)	Pro (CCU)	His (CAU)	Arg (CGU)	U
	Leu (CUC)	Pro (CCC)	His (CAC)	Arg (CGC)	C
	Leu (CUA)	Pro (CCA)	Gln (CAA)	Arg (CGA)	A
	Leu (CUG)	Pro (CCG)	Gln (CAG)	Arg (CGG)	G
A	Ile (AUU)	Thr (ACU)	Asn (AAU)	Ser (AGU)	U
	Ile (AUC)	Thr (ACC)	Ash (AAC)	Ser (AGC)	C
	Ile (AUA)	Thr (ACA)	Lys (AAA)	Arg (AGA)	A
	Met (AUG)	Thr (ACG)	Lys (AAG)	Arg (AGG)	G
G	Val (GUU)	Ala (GCU)	Asp (GAU)	Gly (GGU)	U
	Val (GUC)	Ala (GCC)	Asp (GAC)	Gly (GGC)	C
	Val (GUA)	Ala (GCA)	Glu (GAA)	Gly (GGA)	A
	Val (GUG)	Ala (GCG)	Glu (GAG)	Gly (GGG)	G

译读法是先读表框左边的碱基,再读中间的碱基,最后读右边的碱基。如括号中所示,UCA 表达 Ser,CAU 表达 His,ACU 表达 Thr 等。AUG 也是表达"起始"密码。

Phe(苯丙氨酸,F),Leu(亮氨酸,L),Ile(异亮氨酸,I),Met(甲硫氨酸,M),
Val(缬氨酸,V),Ser(丝氨酸,S),Pro(脯氨酸,P),Thr(苏氨酸,T),
Ala(丙氨酸,A),Tyr(酪氨酸,Y),His(组氨酸,H),Gln(谷氨酰胺,Q),
Asn(天冬酰胺,N),Lys(赖氨酸,K),Asp(天冬氨酸,D),Glu(谷氨酸,E),
Cys(半胱氨酸,C),Arg(精氨酸,R),Trp(色氨酸,W),Gly(甘氨酸,G)。

用人工合成简单的多核苷酸代替天然的 mRNA,来指导带放射性同位素标记的氨基酸合成多肽,以实验推测相应氨基酸的密码,例

如合成一多聚尿苷酸代替 mRNA,加到由大肠杆菌制得的已除去内源 mRNA 之无细胞提取物,并投入放射性同位素标记的氨基酸和 ATP,在一定条件下保温后,观察哪一种标记氨基酸会参入不溶于酸的蛋白质产物中,实验结果表明,仅生成多聚苯丙氨酸,证明了表达翻译成苯丙氨酸的密码是 UUU。同样分别以多聚腺苷酸或多聚胞苷酸代替 mRNA 来合成蛋白质,结果只得到多聚赖氨酸或多聚脯氨酸,这表明 AAA 是表达成赖氨酸信息的密码,而 CCC 是脯氨酸的密码。用其它类似实验方法多次探索,已探讨清楚表达每一种氨基酸的密码。

表 9-1 的 64 种遗传密码中有 61 种是氨基酸的密码,其中 AUG 不仅是甲硫氨酸(或甲酰甲硫氨酸)的密码,也是"起始"密码。UAA、UAG、UGA 是表达终止的密码,即蛋白质合成的终止信号,有的氨基酸密码达 6 种之多。一般来说,遗传密码是通用的,不论是病毒,或原核生物还是真核生物都具有同一套密码。但有些报道指出,酵母链孢霉和哺乳动物线粒体的遗传密码有些不同。如在线粒体中 UGA 是色氨酸的密码而不是终止密码;AUA 是甲硫氨酸的密码,而不是异亮氨酸的密码;CUA 本是亮氨酸的密码,但在线粒体中却是苏氨酸的密码。

归纳以上遗传密码的特点有:(1)密码子的核苷酸排列方向与翻译方向(5′→3′)即 mRNA 起始信号到终止信号的排列方向一致;(2)遗传密码表具有通用性,即除了少数例外,从原核生物到真核生物,甚至病毒都共同采用这套密码,连大肠杆菌 tRNA 的反密码子也能正确阅读真核生物血红蛋白 mRNA 的密码子,合成血红蛋白,以保证生物的连续性;(3)除了个别之外,多数的密码子都对应于相应的氨基酸,几乎每种氨基酸都有好几组密码子,例如,亮氨酸的密码子可有 UUA、UUG、CUU、CUC、CUA 和 CUG 六组,说明密码子存在简并性,于是一个密码子就存在着使用频率,如终止密码最常使用的是 UUA,不同生物的各种氨基酸密码子可能有不同的选择,它们会选择最有效的密码子。但除了亮氨酸、精氨酸和丝氨酸等少数例

外，简并性往往仅涉及第三位核苷酸的变动，密码子的专一性主要由前两个碱基决定；(4)DNA 或 mRNA 链上这些密码子的排列是连续的，每组密码子间没有间隔符号，因此在翻译过程必须有正确的译读起始点，并逐个进行译读，以保证翻译过程读码的连续性，否则就可能错读，得不到正确的翻译产物。假如 DNA 或 mRNA 链上插入或缺失一个核苷酸，也会使以后的翻译发生错读，导致产物结构改变。这是一种移码现象。现已发现如吖啶黄等一些物质能插入 DNA 模板链中引起这种移码突变。

9.5.2 蛋白质合成“工场”核糖体

蛋白质生物合成是一个极其复杂的过程，需要多种生物大分子的协同作用。作为合成蛋白质“模板”的 mRNA 分子，它以其核苷酸顺序按三联体密码子指令，向待合成的蛋白质选择氨基酸排列顺序，来传达由 DNA 转录的遗传信息，运载各种氨基酸之特异分子 tRNA，它具有对应于 mRNA 密码子的反密码子，依据碱基配对的原则，为合成蛋白质运送相应的氨基酸，而核糖体是蛋白质合成的场所，犹如蛋白质装配“工场”，即多个核糖体与 mRNA 组成的多聚核糖体上，各种氨基酸在模板 mRNA 的指导下，并在酶和其它蛋白质的参与下，有秩序地依次以肽链相互邻接，生成具有一定氨基酸排列顺序的蛋白质。

(一)放射性同位素标记的氨基酸跟踪实验

生物化学工作者曾将放射性同位素标记的氨基酸注射到大白鼠体内，经过短时间后，取出肝脏制成浆液，通过离心分离出细胞核、线粒体、微粒体及上清液，分别测定各部分的放射性强度，发现微粒体部分的放射性强度最高。在研究中尚发现，如果将放射性标记的氨基酸与新制备的大白鼠肝之无细胞匀浆混在一起保温，放射性标记氨基酸也会结合到微粒体的蛋白质中，把带有标记的微粒体部分进一步分离后测得结合的放射性标记氨基酸大部分集中在称作核糖体的核糖核酸蛋白颗粒中。

倘若用表面活性剂处理微粒体，可以将核糖体从内质网上分离

出来，超速离心后即可获得纯化的核糖体，将此核糖体与放射性标记的氨基酸混在一起，外加 ATP、Mg^{2+} 和大白鼠肝脏的胞浆上清液部分，然后保温即可合成肽链。其它许多细胞如网织红血球，大肠杆菌等的放射性同位素标记的跟踪实验也证明了核糖体是细胞内蛋白质合成的场所。

(二)核糖体的组成与结构

核糖体是一个球状核糖核酸蛋白颗粒、由一大一小的亚基组成。原核生物(例如大肠杆菌)的核糖体是由沉降系数各为 50S 和 30S 的亚基所组成。50S 的大亚基含 23S rRNA 和 5S rRNA 各一分子，还含约 34 种蛋白质。30S 小亚基含一分子 16S rRNA 和约 21 种蛋白质。上述 55 种蛋白质中除了两种蛋白质尚未完全测得氨基酸排列顺序外，其余的和 3 种 rRNA 的一级结构几乎全部揭示。大肠杆菌的核糖体化学结构即将研究清楚。表 9-2 概括了核糖体的组成和某些性质。在原核细胞中核糖体或以游离状态存在或与 mRNA 缔合，平均含有 15000 个核糖体/每个细胞。

表 9-2　核糖体的组成和某些性质

核糖体	亚　基	rRNA (相对分子质量，核苷酸数)	蛋白质种类
原核生物 29nm 70S	50S MW = 1.8×10^6	5S (40000,120) 23S(1.1×10^6,3000)	约 34
21nm MW = 2800000	30S MW = 1×10^6	16S(5.5×10^5,1500)	约 21
真核生物 32nm 80S	60S MW = 3×10^6	5S (40000,120) 28S(1.4×10^6,5000) 5.8S(——,160)	约 45
约 22nm MW = 4500000	40S MW = 1.5×10^6	18S(约 7×10^5,2000)	约 33

真核细胞的核糖体由沉降系数各为60S和40S的两个亚基所组成,60S大亚基含28S rRNA,5S rRNA各一分子和约45种蛋白质,哺乳动物的大亚基还含5.8S rRNA。40S小亚基含18S rRNA和约33种蛋白质。每个细胞含有$10^6\sim10^7$个核糖体,或以游离状态存在,或和内质网结合。真核细胞的线粒体和叶绿体中也含有核糖体,其组成近似于细菌、放线菌、蓝绿藻等原核生物的核糖体,没有5.8S RNA成分。

(三)核糖体结构图解与mRNA、tRNA在合成中相互关系

核糖体可作为一个分子机构,具有许多配合部分以选择参与蛋白质合成的各个组分,并参与识别多肽链的启动,延伸和终止的各种因子,以调度其沿含遗传信息之mRNA逐步"移动"。图9-19示出核糖体的肽基部位和氨酰基部位在50S亚基上,结合mRNA的部位在大小亚基间接触面上。核糖体上还有结合起始因子,延长因子,释放因子,终止因子和各种酶的部位。

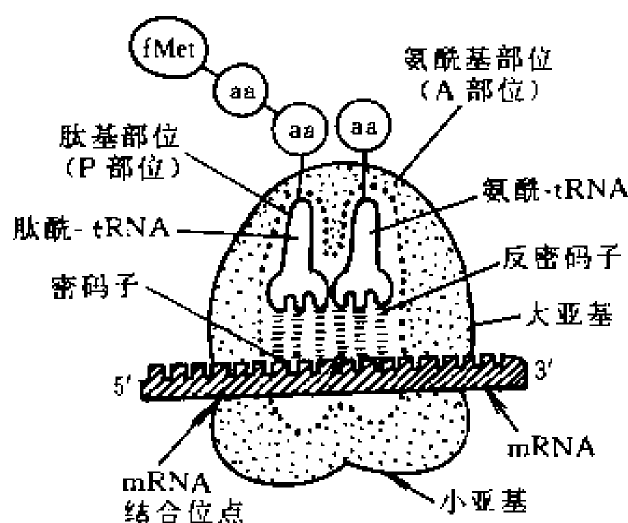


图9-19 大肠杆菌核糖体结构的图解示意

(aa代表各种氨基酸残基)

在蛋白质生物合成时,核糖体必须先和mRNA结合,并在合成过程中沿mRNA以两者相反方向逐步移动,每次相对移动距离相当于一个密码子。

在合成过程中,tRNA 根据密码子和反密码子碱基配对的原则运载着相应的氨基酸和 mRNA 结合,同时 tRNA 也和核糖体结合。在核糖体上有两个和 tRNA 结合的不同位点,一个专门接纳新参入的氨酰 tRNA,称为氨酰 tRNA 结合位点,又称 A 位点;另一个则与延伸中的肽酰 tRNA 结合,称为肽酰 tRNA 结合位点,又称 P 位点。它们都占有三个核苷酸(即一个密码子)的空间位置。

(四)转移 RNA 的作用

天然蛋白质在生物合成过程中的 20 种氨基酸都需有自己特定的 tRNA 进行运送,而一种氨基酸常可有数种 tRNA 运送。这就造成 tRNA 的种类达数十种之多。它们在 ATP 提供自由能以及酶的催化下,可分别与特定的氨基酸结合。并且每个 tRNA 都有一个由三个核苷酸组成的特殊反密码子,能根据碱基配对原则与 mRNA 上对应的密码子相结合。于是各个 tRNA 带着其所选择的不同氨基酸,较准确地依次与 mRNA 分子上密码子相结合,促使氨基酸按一定顺序排列合成蛋白质。

9.6 蛋白质生物合成的翻译机制

生物合成蛋白质的翻译机制较复杂,整个过程需要 tRNA、mRNA、核糖体,有关各种蛋白质因子等约 200 种生物大分子参加的协同作用,表 9-3 归纳了大肠杆菌蛋白质翻译过程中所需的主要成分。蛋白质合成的翻译过程大致上归为四个阶段:(一)氨基酸的激活;(二)肽链合成的启动;(三)肽链的延伸;(四)翻译的终止和蛋白质的释放。

表 9-3 大肠杆菌蛋白质翻译过程中所需的主要成分

阶　段	主要参与成分
氨基酸的激活	氨基酸 tRNA 氨酰-tRNA 合成酶

续表

阶　　段	主要参与成分
起动阶段	ATP, Mg^{2+} 甲酰甲硫氨酰-tRNA mRNA 的起始密码(AUG) 30S 和 50S 核糖体亚基 起始因子(IF_1, IF_2 和 IF_3) GTP, Mg^{2+}
肽链延伸	70S 核糖体 mRNA 的翻译信息密码 氨酰-tRNA 延长因子(EFTu, EFTs 及 EFG) GTP, Mg^{2+}
终止与释放	70S 核糖体 mRNA 的终止密码(UAA, UAG 及 UGA) 释放因子(R_1, R_2, R_3, RR) GTP, Mg^{2+} 脱甲酰酶及氨肽酶

9.6.1　氨基酸的激活

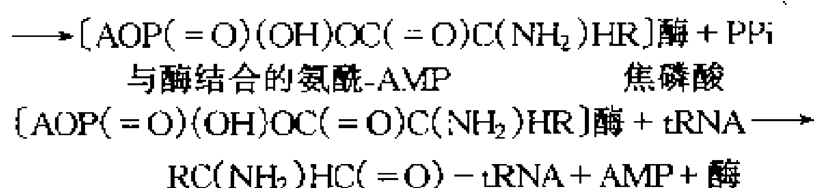
游离的氨基酸在结构上没有识别 mRNA 上密码子的相应反密码子，也不具备越过势垒而彼此间有直接反应形成肽键的活化能条件，因此参与蛋白质合成的氨基酸必须先由特异的活化酶体系激活，并和相应的 tRNA 结合，形成氨酰 tRNA 才能参与蛋白质合成反应。

激活氨基酸的特异酶系是各种相应的氨酰 tRNA 合成酶，在它的作用下，可催化相应的氨基酸羧基与 tRNA 3′-OH 缩合生成氨酰-tRNA 而被活化，即



$$HOC(=O)CH(NH_2)R + ATP \xrightarrow{酶, Mg^{2+}} [ATP \cdot HOOCC(NH_2)HR] \cdot 酶$$

过渡态络合物



$$\longrightarrow [AOP(=O)(OH)OC(=O)C(NH_2)HR]酶 + PPi$$

与酶结合的氨酰-AMP　　　　焦磷酸

$$[AOP(=O)(OH)OC(=O)C(NH_2)HR]酶 + tRNA \longrightarrow$$

$$RC(NH_2)HC(=O)-tRNA + AMP + 酶$$

tRNA是由80个左右核苷酸组成相对分子质量约为25000的RNA分子,它具有三叶草型的构型,3′-端都以-CCAOH接尾,5′-端一般是PG。各种tRNA分子结构中都有相应的反密码子,以便能识别mRNA上的对应密码子和保证在蛋白质合成过程中运送适当的氨基酸。

由于tRNA合成酶具有很高的专一性,所以各种氨基酸是需要各自的组成很不相同的专一合成酶催化活化的,对于真核细胞,每种氨基酸常有一个以上专一的合成酶。氨基酸被活化后变为高能形式,并转移到tRNA分子上。

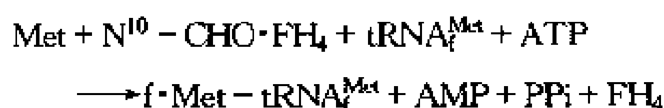
9.6.2 翻译的启动

在氨基酸活化后,第一个合成启动的通常是甲硫氨酸,而参与合成启动的甲硫氨酸运载体是 $tRNA_f^{Met}$,所以在真核细胞中参与启动的氨酰tRNA是 $Met\text{-}tRNA_f^{Met}$,即



$$Met + tRNA_f^{Met} + ATP \longrightarrow Met - tRNA_f^{Met} + AMP + PPi$$

在原核生物中甲硫氨酸需要甲酰化,即由甲酰化酶催化形成的甲酰甲硫氨酰-tRNA(简记为 $fMet\text{-}tRNA_f^{Met}$)就能参与翻译的启动,即



$$Met + N^{10} - CHO \cdot FH_4 + tRNA_f^{Met} + ATP$$

$$\longrightarrow f \cdot Met - tRNA_f^{Met} + AMP + PPi + FH_4$$

研究发现,大肠杆菌的粗提取液中加入甲硫氨酸,特别是甲酰甲硫氨酸会很大程度上促进蛋白质的合成。以后的实验证明,原核生物蛋白质的合成是从活化的甲酰甲硫氨酸开始的。

在翻译启动时还需要一些多条肽链组成的启动因子,关于原核生物中的启动因子是 IF_3、IF_2 和 IF_1。对于真核生物则是 eIF_1、eIF_2、eIF_3、eIF_{4A}、eIF_{4B}、eIF_{4C}、eIF_{4D} 和 eIF_5。

在蛋白性质的启动因子 IF_1、IF_2、IF_3 和 Mg^{2+} 存在下,tRNA载

着甲酰甲硫氨酸($fMet\text{-}tRNA_f^{Met}$)装配到附在mRNA处的核糖体30S小亚基上，并与GTP结合生成起始复合体30S-mRNA·fMet·tRNA$_f^{Met}$·GTP而释放出IF_3。接着，伴随GTP的水解(生成GDP和Pi)和核糖体的50S大亚基参加结合，便生成f·Met·tRNA·mRNA·70S的启动络合物而释放出IF_1、IF_2。

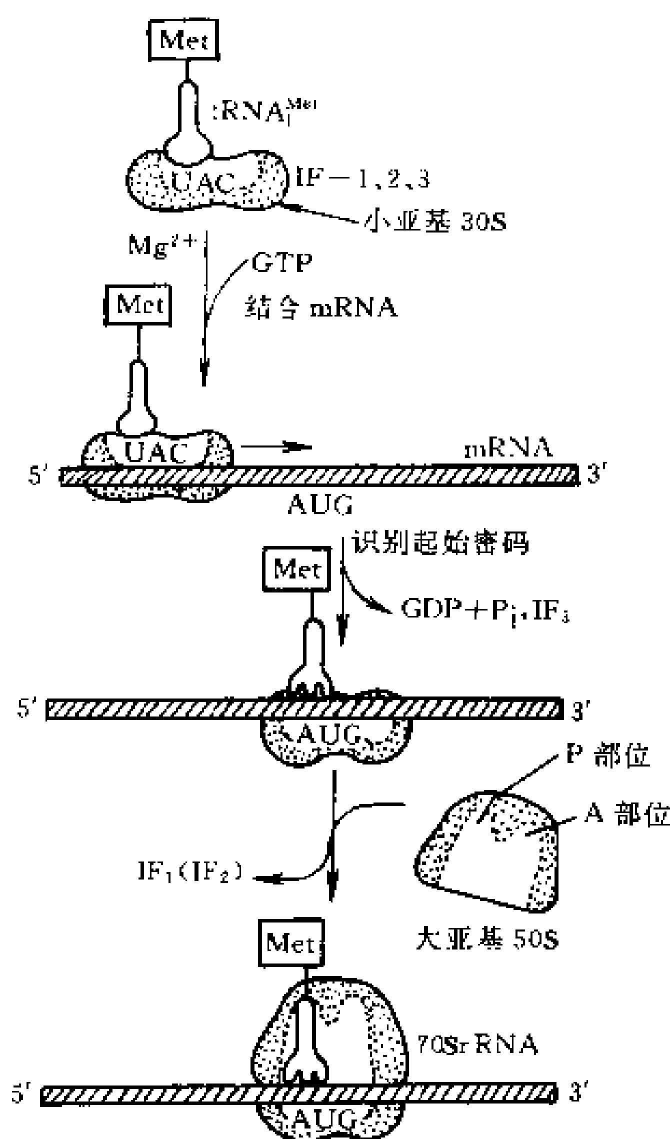


图9-20 翻译启动示意

IF_3释放前在其中的作用很可能是阻止小亚基和大亚基过早地结合，协助mRNA的5′-端和16S tRNA的3′-端结合，使mRNA正

确定位，并可能在 IF_1 协同作用下促进 mRNA 在翻译启动区形成适合的高级结构，以便起始密码 AUG 能容易地被 fMet-$tRNA_f^{Met}$ 所识别，IF_1（可能还有 IF_2 协同作用）的作用是促进核糖体 70S 和附着的 mRNA 及与起始密码 AUG 配对的 f·Met-$tRNA_f^{Met}$ 形成上述的启动络合物。

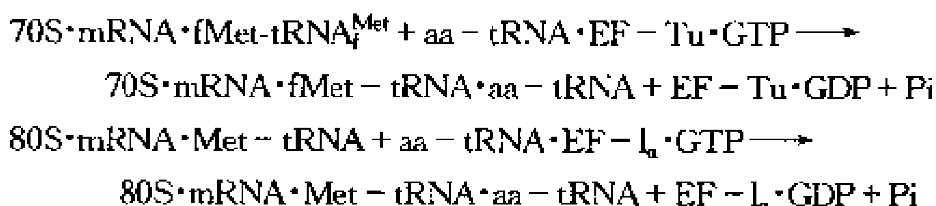
当大亚基与小亚基结合形成一个功能完全的核糖体，所有和小亚基结合的启动因子（IF_1、IF_2 等）完全脱去，此时 f·Met·tRNA 占据了核糖体上肽基部位（P 部位），并空出 A 部位准备接受下一个氨酰 tRNA 以进行肽链的延伸。图 9-20 示出了翻译启动步骤。

在翻译启动时，还发现一种专一于甲硫氨酸的 tRNA，它可能的主要作用是作为肽链内甲硫氨酸的载体，以 $tRNA_m^{Met}$ 符号代表之。

9.6.3 肽链的翻译延伸

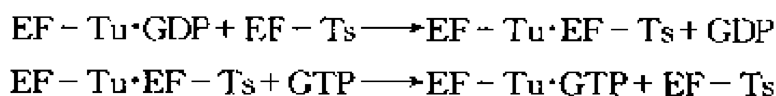
启动过程完成后，核糖体上空出的 A 部位将接受新的氨酰-tRNA，而 P 部位上(f)Met 将转位 A 部位进行肽链延伸，此过程约可分三步骤，由图 9-21 示意，每步都需要在相应的作用因子促进下完成。

第一步，在原核生物中需要的延伸因子是 EF-Tu 和 EF-Ts，在真核细胞中需要类似的延伸因子 EF-1_α 和 EF-1_β 参加。例如在原核生物中的 EF-Tu 延伸因子具有很高专一性，能和 GTP 及氨酰-tRNA（即 aa-tRNA）结合，并将氨酰-tRNA 引入 A 部位，由新氨酰-tRNA 识别相应的密码子而定位。



$$70S\cdot mRNA\cdot fMet\text{-}tRNA_f^{Met} + aa-tRNA\cdot EF-Tu\cdot GTP \longrightarrow$$
$$70S\cdot mRNA\cdot fMet-tRNA\cdot aa-tRNA + EF-Tu\cdot GDP + Pi$$
$$80S\cdot mRNA\cdot Met-tRNA + aa-tRNA\cdot EF-1_\alpha\cdot GTP \longrightarrow$$
$$80S\cdot mRNA\cdot Met-tRNA\cdot aa-tRNA + EF-1_\alpha\cdot GDP + Pi$$

上述第一步完成后，EF-Tu·GDP 需在 EF-Ts 和 GTP 的作用下变回 EF-Tu·GTP，才能重新发挥作用。

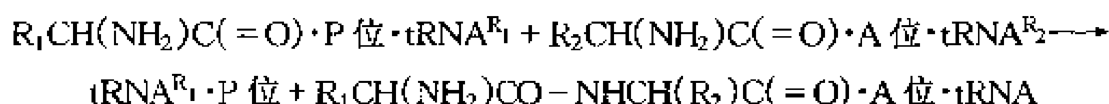


$$EF-Tu\cdot GDP + EF-Ts \longrightarrow EF-Tu\cdot EF-Ts + GDP$$
$$EF-Tu\cdot EF-Ts + GTP \longrightarrow EF-Tu\cdot GTP + EF-Ts$$

随后，第二步是占据 P 部位的 fMet-tRNA（或者已形成的肽链-

tRNA)在50S大亚基上的转肽酶催化下，fMet脱离相应的tRNA，并以其羧基和进入A部位的氨酰-tRNA上氨基形成肽键，于是在A部位处产生肽酰-tRNA，而P部位上的tRNA脱落。

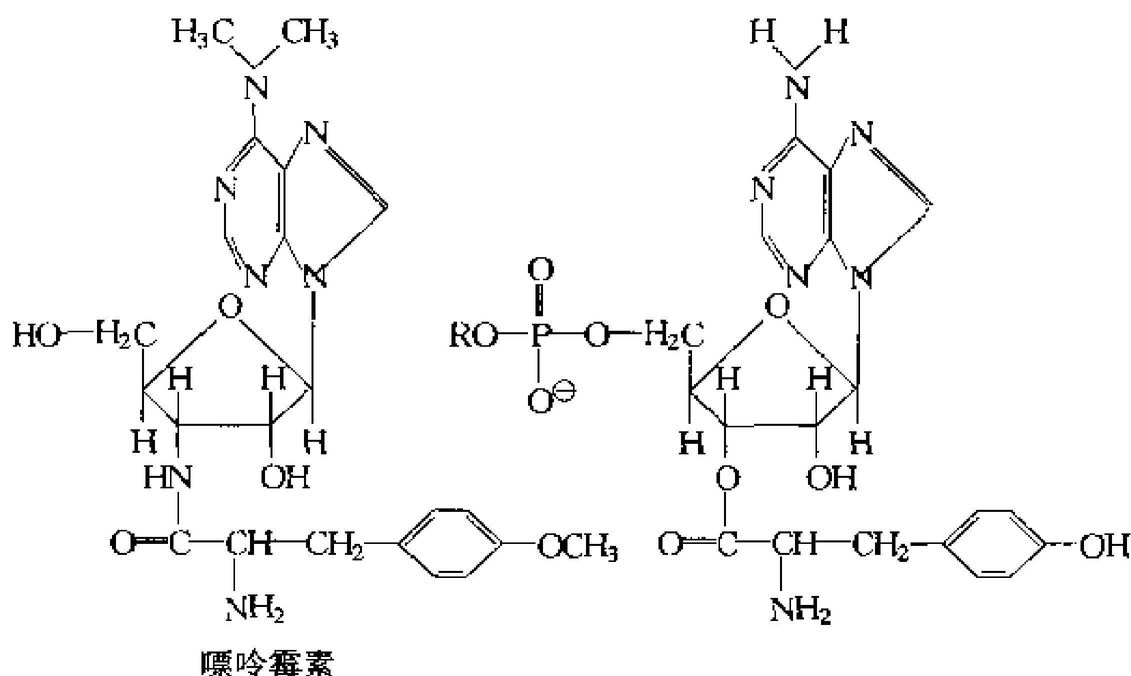
肽酰转移酶(简称转肽酶)是核糖体大亚基的组成成分，它们结合很紧密，发挥作用时需要较高的K^+浓度。



$$R_1CH(NH_2)C(=O)\cdot P\text{位}\cdot tRNA^{R_1} + R_2CH(NH_2)C(=O)\cdot A\text{位}\cdot tRNA^{R_2} \longrightarrow$$
$$tRNA^{R_1}\cdot P\text{位} + R_1CH(NH_2)CO-NHCH(R_2)C(=O)\cdot A\text{位}\cdot tRNA$$

在原核生物和真核细胞中转肽形成肽键以延伸肽链的过程基本上相同。

嘌呤霉素和氨酰tRNA的结构示意如下：



嘌呤霉素

由于它们在结构上很相似，嘌呤霉素在肽酰转移酶催化下可形成肽酰嘌呤霉素络合物，而易从核糖体上脱落，致使肽链的延伸受到抑制。

肽链形成后的第二步骤是移位过程，此时在转位酶催化和GTP水解供能以及延伸因子EFTs与EFTu也参与下，P部位上原有留下的tRNA被释放出来，核糖体沿mRNA作5′→3′方向的相对滑动，携带着肽基的tRNA从A部位移到了P部位，或者说生成的肽酰

tRNA 从 A 部位转入 P 部位,每次移位距离为 3 个核苷酸(即相当于一个密码子),于是下一个密码进入 A 部位,使空着的 A 部位又可接受第三个相应的氨酰-tRNA 占位。

以后肽链上每增加一个氨基酸残基,便按照新氨酰-tRNA 进入 A 部位(占位),继而形成新肽键转肽,随后 P 部位上 tRNA 在转肽后脱落,接着核糖体移位而带肽链的 tRNA 转位至 P 部位,腾空了 A 部位,进行着循环重复过程,直至肽链延伸至必需的一定长度。

转位酶在原核生物中相当于延伸因子 EF-G,因此又称 G 因子,在真核细胞中相当于 EF-2,不过易受白喉毒素抑制而失去活性。它是巯基蛋白,对 GTP 有强的亲和力,转位过程需要的能量即由 GTP 水解提供。

大肠杆菌中肽链的延伸速度约 20 个氨基酸残基/秒,而真核细胞中约为 1 个氨基酸残基/秒。

9.6.4 肽链合成的终止和释放

肽链合成的终止是由 mRNA 链上终止密码子指导的,已知终止密码子有 3 种:UAA、UAG 及 UGA。终止反应在原核生物中需要 3 种辅助因子,RF-1 因子能识别 UAA 和 UAG,RF-2 会识别 UAA 和 UGA,RF-3 具有 GTP 酶活性,能激活 RF-1 和 RF-2,促进释放多肽链的速度,所以三者又称释放因子。在真核细胞中辅助因子为一个 RF。

图 9-22 示出可能的终止合成和释放的机制。当肽链延伸到一定长度,mRNA 上某一终止密码子进入 A 部位,即被有关释放因子识别而和终止密码子结合,导致新的氨酰-tRNA 不能再进入 A 部位而终止了延伸反应。此时终止密码子与释放因子的结合反应进一步影响肽酰转移酶对 P 部位上的催化转肽作用而变成催化水解作用,使 P 部位上多肽链与 tRNA 之间的酯键加水脱开。tRNA 从 P 部位上脱落,游离肽链进入细胞质。同时 mRNA 和释放因子等也相继脱离核糖体,核糖体解体为 30S 和 50S 两亚基,上述蛋白质分子的翻译终止,而 30S 和 50S 两亚基将进行另一新蛋白质分子的翻译合成。

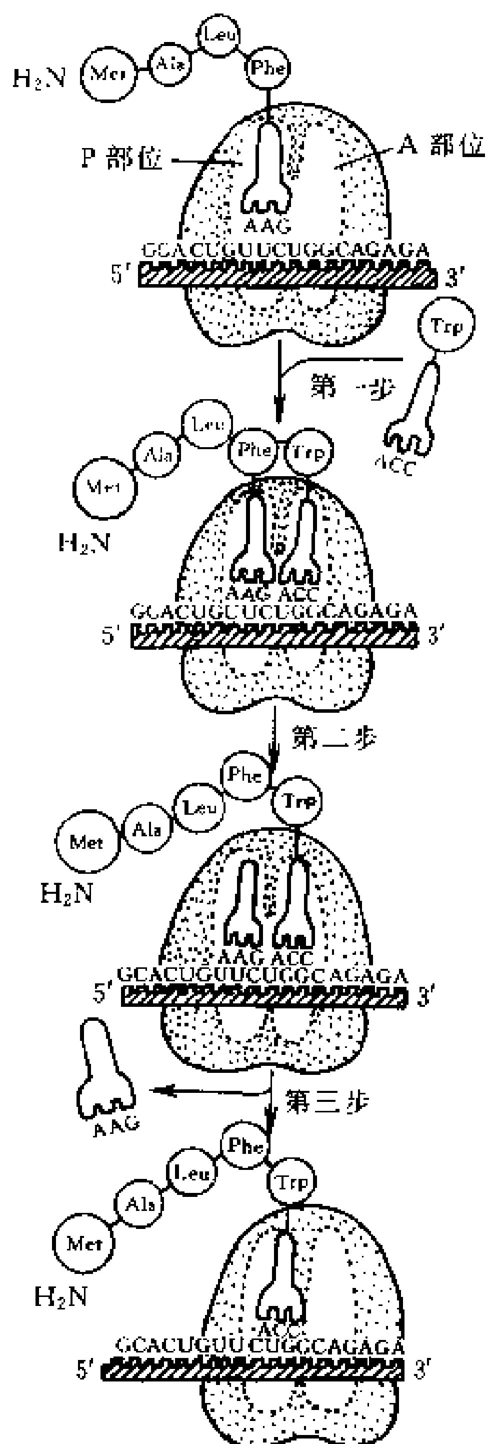


图 9-21　翻译延伸示意

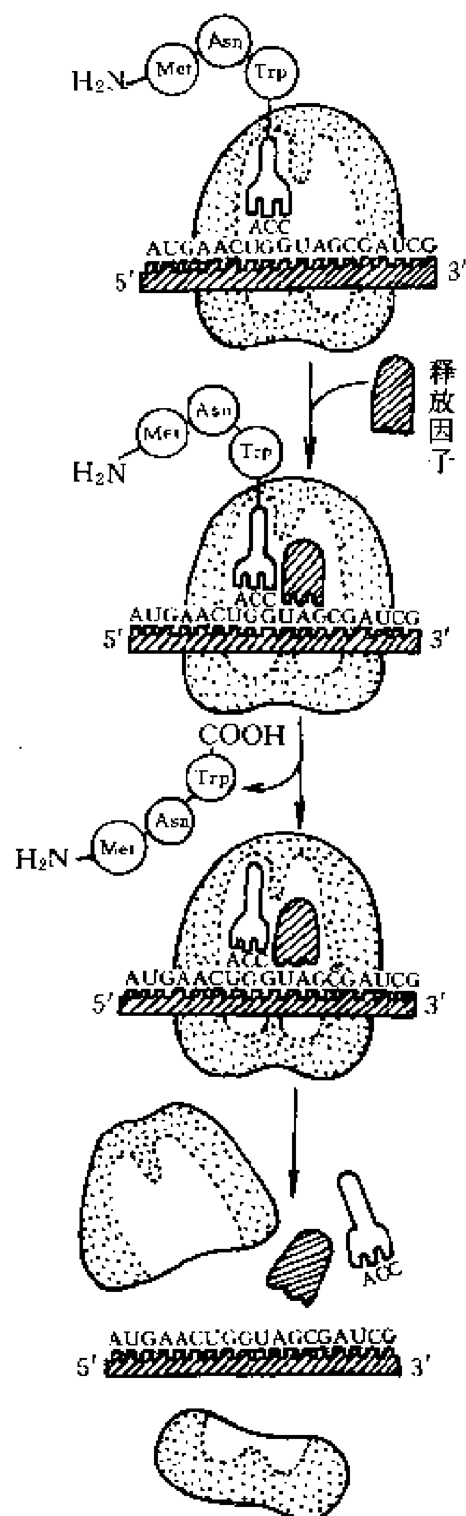


图 9-22　翻译终止示意

以上所述的是单个核糖体上翻译肽链的情况，实际上生物体内

常是多个核糖体同时与同-mRNA 相结合，每个核糖体均按上述翻译过程在 mRNA 模板指导下，各自进行肽链的合成。现已了解生物体内的各种 mRNA 有长有短，例如，合成血红蛋白多肽链的 mRNA 分子较短，能结合 5～6 个核糖体，合成肌球蛋白多肽链的 mRNA 较大，可结合 50～60 个核糖体。所以不同长短的 mRNA 可以同时合成不同数量又不同长短的肽链。

蛋白质翻译合成是生物体内耗能最高的生物合成过程之一，通常每合成一个肽链至少需要消耗 4 个高能磷酸键，其中有二个高能磷酸键是 GTP→GDP 反应供能，分别用于氨酰-tRNA 与核糖体 A 部位的结合和促进核糖体沿 mRNA 的移位，还有二个一般是 ATP 中高能磷酸键(ATP→AMP + PPi)供能消耗于形成氨酰-tRNA 的过程中。

9.6.5 蛋白质生物合成的调控

蛋白质生物合成会受到多种因素例如激素、营养条件、转录、翻译及翻译后加工等各种水平上的调控。研究发现，原核生物除了转录调控外，翻译调控也起着重要作用。当一种生物的核糖体蛋白基因引入大肠杆菌时，密码翻译该蛋白的 mRNA 量会很快上升，而蛋白质本身合成的速率却很少改变，这暗示该蛋白对 mRNA 翻译的反馈阻遏。当游离的核糖体蛋白加入非细胞蛋白合成系统时，会专一地阻遏密码该蛋白之 mRNA 的翻译，进一步表明过量的产物蛋白质会专一地和密码的 mRNA 5′端特定顺序结合，反馈地阻止自身的合成。这是一种翻译水平上的调控。对于真核细胞，翻译水平的调控表现在蛋白质合成总速率的控制上。

在研究内质网提取液对血红蛋白亚基的合成实验中还发现，当血红素不存在时，这种亚基的合成便会受阻，即真核生物体内 eIF-2 激酶能催化 eIF-2 蛋白质翻译启动因子进行磷酸化，促使正常情况下具有启动活性的 eIF-2 失去活性，该激酶又受由 cAMP 影响的另一激酶的控制，通常血红素抑制着该激酶系统的活性，若血红素缺乏时，这激酶系统呈现出活性，eIF-2 便可逆地磷酸化失活，血红蛋白翻

译合成受阻。

蛋白质生物合成除了受到生理运行上的调控外，还可遭受某些抑制剂例如一些抗菌素或毒蛋白等的抑制。在抗菌素中有的对原核生物是专一的，有的却专一于真核细胞的翻译合成系统。四环素(tetracycline)等能专一抑制氯酰-tRNA 和 30S 的结合；链霉素(streptomycin)、卡那霉素(kanamycine)等却专一地和 30S 结合，改变核糖体的构象，导致误读；而氯霉素(chloromycetine)则能与 50S 结合，阻碍 70S·mRNA 络合物上肽链的生成；前述类似氨酰 tRNA 的嘌呤霉素，能引起肽链不成熟释放。高效杀霉菌剂放线菌酮(化学名亚胺环己酮，cycloheximide)能专一地和 80S 结合，抑制真核生物的肽酰转移酶。众所周知的白喉毒素是一种使 eEF-2 失效的毒蛋白。还有一种蓖麻蛋白可使 60S 失效。

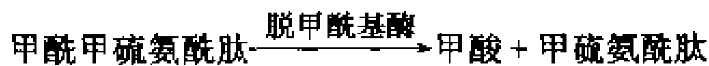
9.7 蛋白质的翻译后加工

由 mRNA 翻译所得的多肽链，大多数是无功能活性的蛋白质，往往还需要经过各种方式的翻译后加工才能变为有一定生物功能活性的蛋白质。根据已发现的翻译后加工可归纳为以下几种：

9.7.1 水解加工

蛋白质的翻译后加工的普遍又主要的一类方法是水解。

多肽链 N-端(甲酰)甲硫氨酸是肽链翻译合成的起始氨基酸，往往是在肽链合成后，首先由脱甲酰基酶和甲硫氨酸氨肽酶催化水解除去，促使肽链形成所需要的构象：

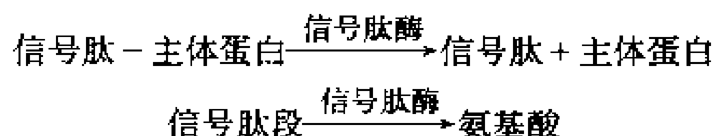




甚至在氨肽酶作用下会切除掉多个 N-端氨基酸。在真核生物中，常在肽链的部分还未完全合成时，便已将 N-端的甲硫氨酸水解切除下来。

大多数分泌蛋白与膜糖蛋白，在 N-端一般都有一小段由 20～30

个氨基酸组成的前“Pre-”顺序，其中含 8～10 个强疏水性的氨基酸，这段肽被称为信号肽，其作用是有助于主体蛋白穿过磷脂层，分泌到膜外，完成分泌的穿透过程中即被信号肽酶水解切除，即



$$\text{信号肽}-\text{主体蛋白}\xrightarrow{\text{信号肽酶}}\text{信号肽}+\text{主体蛋白}$$

$$\text{信号肽段}\xrightarrow{\text{信号肽酶}}\text{氨基酸}$$

9.7.2 蛋白质(或酶原)的激活

在通常情况下，有些特定生理功能的蛋白质激素和酶是以原“Pro-，-ogen”的形式存在，没有呈现出功能性质。但在需要时，会通过水解切去具有阻遏性质的肽段部分，而变为功能态结构。例如，胰岛素是由胰脏细胞膜结合多核糖体合成的，其初产物为胰岛素原前体，它是由 24 个氨基酸残基组成的信号肽和 81 个氨基酸残基分三段(A、B、C，参见图 9-23)组成的胰岛素原衔接而成。分泌时先由信号肽酶作用切除信号肽段，随后再由蛋白酶类和羧肽酶 B 等协同作用切去 31～59 之间的肽段 C，生成成熟而有特定构象的胰岛素是由两对二硫键连接 A 与 B 两肽段组成的。

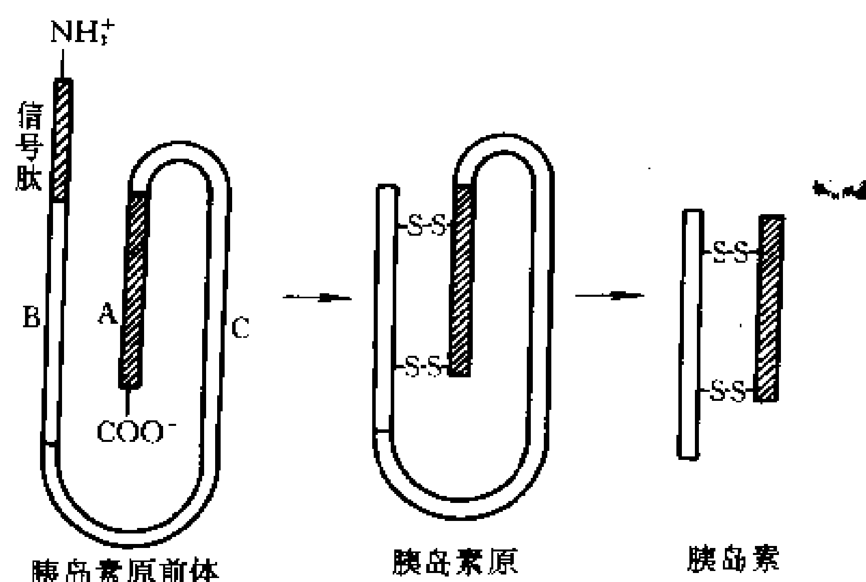


图 9-23　胰岛素原前体后加工

图 9-24 是胰凝乳蛋白酶原后加工活化的示意。此酶原是由 245

个氨基酸残基组成，在五对二硫键连接下使肽链形成一定构象的无活性形态。当在胰蛋白酶作用下切开 15～16 残基，就会由无活性形态转变成有活性的 π-胰凝乳蛋白酶形态。再在胰凝乳蛋白酶作用下转变为 α-胰凝乳蛋白酶等活性形态。

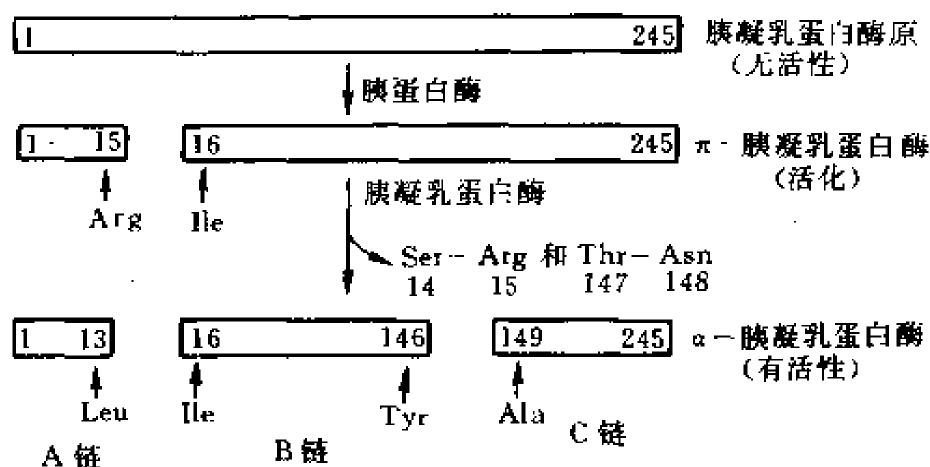


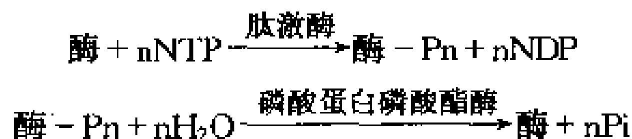
图 9-24　胰凝乳蛋白酶原活化过程

胰蛋白酶的激活是在肠激酶（或称肠肽酶）的作用下，移去胰蛋白酶原 N-端 Val、Asp、Asp、Asp、Asp、Lys 六肽后就变为活性胰蛋白酶。

9.7.3　修饰

肽末端的乙酰化，或者酰胺化是后加工中最简单的修饰类型。当大肠杆菌核糖体蛋白 L7/L12 全部乙酰化时，细菌的生长速率会发生变化。

磷酸化、腺苷酰化等这类修饰通常与功能蛋白如酶等的活性调节有关。其中了解最多的是磷酸化，这类可逆的共价修饰与脱磷酸化进行的酶活性调节，现概括如下：



$$\text{酶} + \text{nNTP} \xrightarrow{\text{肽激酶}} \text{酶} - \text{Pn} + \text{nNDP}$$

$$\text{酶} - \text{Pn} + \text{n}H_2O \xrightarrow{\text{磷酸蛋白磷酸酯酶}} \text{酶} + \text{nPi}$$

式中　NTP——代表核苷三磷酸；

Pi——代表无机磷酸。

例如，催化糖元（葡萄糖$_n$）+ 磷酸→葡萄糖-1-磷酸 + 糖元（葡萄糖$_{n-1}$）的糖元磷酸化酶，可以 a 与 b 两种形式存在。在正常生理条件下，该酶 b 的别构位点被 ATP 竞争性结合代替了 AMP 而使之失去活性，它在磷酸化酶激酶等组成的酶体系催化下，可以转变为磷酸化酶 a，该酶 a 在正常生理条件下无需结合 AMP 也具有完全的活性。磷酸化酶 a 通过磷酸化酶的磷酸酯酶催化也可逆转变为该酶 b。

还有羟基化修饰，尤其是脯氨酸的羟基化。如对胶原蛋白中脯氨酸和赖氨酸的羟基化有增加其稳定性的效应，这可能和改变蛋白质结构有关。

在真核细胞中蛋白质的糖苷化比较普遍，许多分泌蛋白和膜蛋白都是糖苷化了的糖蛋白。糖蛋白生物合成过程很复杂，糖苷化的连接方式有两种类型：一种是糖苷基连于丝氨酸或苏氨酸的羟基为 O-连接型，糖苷链短（一般仅 1～3 个糖残基）；另一种是糖苷基连于天冬酰胺的氨基上为 N-连接型。糖苷化修饰在肽链延伸阶段就开始了。糖苷化有关酶存在于内质网膜上。

某些酶在其表达功能时，需要血红素、硫辛酸或磷酸吡哆等辅基的缔合，多肽链合成后和它们常以络合物形式存在。

9.7.4 二硫键的形成

信使 RNA 含有的 UGU、UGC 是密码半胱氨酸，而没有指令胱氨酸参入肽链顺序结构的密码子。二硫键应是合成的多肽链中两个半胱氨酸残基的侧硫氢基间通过氧化形成的。二硫键的形成对增加蛋白质的稳定性和形成一定的空间高级结构有着重要作用。在高等生物中二硫键主要存在于分泌蛋白、膜蛋白和某些结构蛋白。二硫键的形成反应是由蛋白质二硫键还原酶的催化，和有氧化型谷胱甘肽（GSSG）为氧化剂的参与。该键形成过程往往是和肽链延伸同时进行的。

结 束 语

当生命物质核酸的复制合成、转录与反向转录和蛋白质的翻译合成，以及它们接受酶水平上的调控与组成生物的最基本单元——细胞水平上的调节，甚至激素水平和更高级的神经水平等生理上调节，构成了生物机体内一个完整统一的新陈代谢过程，便能维护生命的正常运行，而使生物的遗传性状得以延续。然而机体内各种新陈代谢的反应过程是密切地相互作用与相互制约的，并有规律地引起机体的振荡效应，从而保证了生命的持续活动。如果由于某些内因或外源造成某一方面新陈代谢的亢进或阻遏，将会引起生理失调，导致机体产生疾患或者甚至严重的生命活动障碍，这是值得人们注意的。

第十章　维生素和辅酶及激素的结构与性能

10.1　维生素、辅酶和激素简介

维生素是人们维持生命活动所必需的七大营养素(蛋白质、脂肪、碳水化合物、维生素、无机盐、氧气和水)之一,是一类调节生物正常生长与代谢的不可缺少的微量小分子有机物。人与高等动物本身一般不能合成,必须从食物中摄取。如果机体缺少某种维生素,有关物质的代谢过程发生了障碍,便会导致产生缺少相应维生素的病症。

维生素的种类颇多,它们的化学结构有很大的差异,通常是按溶解性质来分类,即分为脂溶性维生素和水溶性维生素。

(一)脂溶性维生素

此类维生素有:维生素 A(视黄醇)、维生素 D(钙化醇)、维生素 E(生育酚)、维生素 K(凝血素)等。

(二)水溶性维生素

它包括维生素 B_1(硫胺素)、维生素 B_2(核黄素)、泛酸(遍多酸)、维生素 PP(尼克酰胺或烟酰胺)、维生素 B_6(吡哆类)、生物素(H)、叶酸(R 或 M)、维生素 B_{12}(钴胺素)和维生素 C(抗坏血酸)等。

多数的维生素是作为辅酶或辅基的组成成分参加体内的代谢过程,例如硫胺素、核黄素、尼克酰胺、泛酸、叶酸等都分别参与了各种辅酶的组成。还有抗坏血酸等本身就充当了辅酶。辅酶在酶催化反应中有二种表现:一种是在两种酶之间扮演成某种原子或化学基团的载体;另一种是作为某一酶的辅酶而充当某种原子或化学基团的载体。不同的辅酶作为载体所转移的原子或化学基团,常见的有氢原子、氨基、一碳基团、磷酸基团等各不相同。

激素是生物体内另一类不可缺少的微量有机化合物，在机体的代谢和各种正常活动中起着十分重要的调节作用。生物的生长发育和适应外界环境等往往需要各种激素来发挥其特有的作用，如果某一激素分泌失去平衡，便会像维生素缺乏那样发生相应的疾病。

现以动物在正常生长的情况为例来说明，血液循环中蛋白质激素的浓度水平为 $10^{-10} \sim 10^{-12}$mol/L，类固醇激素的浓度水平是 $10^{-6} \sim 10^{-9}$mol/L。它们可以由生物自身的内分泌细胞合成产生，在机体内有的分泌细胞比较集中于特殊的内分泌腺体中如肾上腺、性腺等，有的分散于各器官组织，如胃、肠粘膜激素，或某些神经细胞中所分泌的激素是由体液运送到相应的靶细胞或靶组织而呈现其功能。

人们根据激素的来源，简单地分为动物激素、昆虫激素和植物激素，还进一步按化学组成的特点，将它们大体上分成5种类型：(1)氨基酸衍生物类激素；(2)多肽和蛋白质类激素；(3)甾醇类激素；(4)脂肪族激素；(5)苯环及杂环类激素。

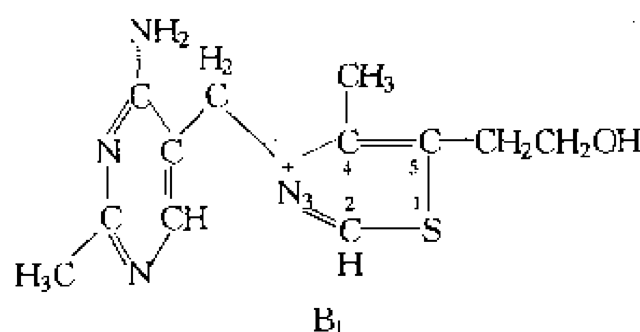
根据激素在结构上与水的亲和性质，也可大体归纳为两种类型：一类是亲水分子如多肽、蛋白质类激素；另一类是疏水分子如甾体类激素、甲状腺素。

10.2 水溶性维生素

水溶性维生素在体内通常都以辅酶形式发挥作用，在肝脏内的含量最丰富，多余的维生素在体内不会贮存而自尿中排出。

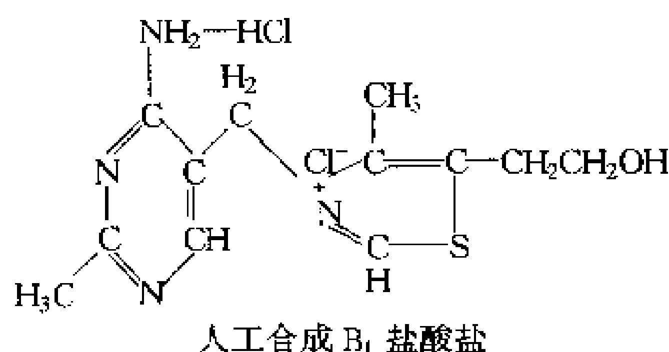
10.2.1 维生素 B_1 和脱羧酶的辅酶

维生素 B_1(硫胺素)在植物中分布广泛，主要存在于谷物、豆类等种子外皮(如米糠、麦麸)和胚芽中，酵母中含量也很高，白菜、芹菜和瘦肉中亦较多，它是含嘧啶环和噻唑环组成的化合物。维生素 B_1 的化学结构如下：



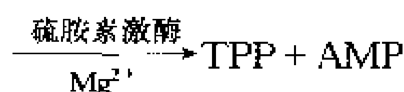
B_1

或



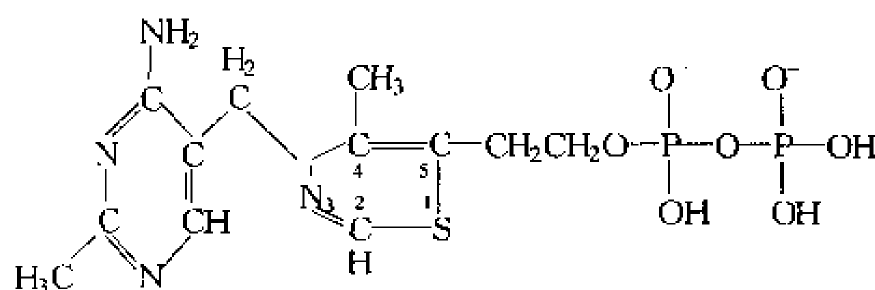
人工合成 B_1 盐酸盐

它在机体内由硫胺素激酶催化而以焦磷酸硫胺素（Thiamine Pyro Phos phate，TPP）的形式存在，但要消耗 ATP，即　硫胺素 + ATP



$\xrightarrow[Mg^{2+}]{\text{硫胺素激酶}}$ TPP + AMP

TPP 是催化丙酮酸或 α-酮戊二酸氧化脱羧反应的脱羧酶之辅酶，其化学结构式为



与脱羧酶结合的 TPP，在噻唑环上 2 号位碳原子是具有活泼的反应活性，它能与丙酮酸中 α-位碳原子结合而进行脱羧反应，生成 CO_2 和连接在噻唑环上的羟乙基，即

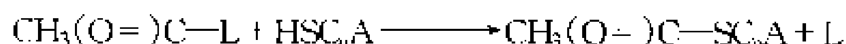


$$H_3C(O=)CCOOH + TPP \xrightarrow{\text{丙酮酸脱羧酶系}} H_3C(HO)HC—TPP + CO_2$$

后经二氢硫辛酸转乙酰基酶（DLT）辅助因子硫辛酸 [$SCH_2CH_2C(S)H(CH_2)_4COOH$，代号 L]的协同作用，帮助羟乙基转移且脱氢而氧化成乙酰，致使 TPP 充当转移羟乙基的传递体，即



$$H_3C(HO)HC—TPP + L \longrightarrow CH_3(O=)C—L(\text{碳硫键连接}) + TPP$$



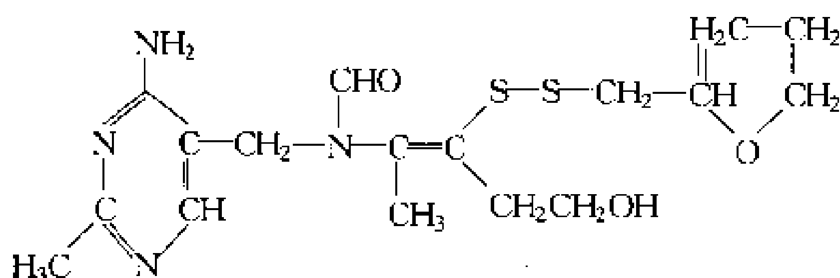
$$CH_3(O=)C—L + HSC_oA \longrightarrow CH_3(O=)C—SC_oA + L$$

硫辛酸也可认为是协同 α-酮酸氧化脱羧酶的辅酶焦磷酸硫胺素发挥作用的一种辅酶，它又将乙酰基转移给辅酶 A，生成乙酰辅酶 A 而进入三羧酸循环，使丙酮酸在体内形成一种调节代谢的"平衡"而不会积累。

当维生素 B_1 缺乏时，体内 TPP 含量短缺，丙酮酸氧化脱羧反应受阻，造成糖代谢障碍，丙酮酸在血、脑、尿和神经组织中的含量升高和积累，从而引起多发性神经炎。另一方面，主要靠糖氧化供能的神经组织，在维生素 B_1 缺乏时，因供能不足而降低了组织活力，致使引起四肢麻木无力，心力衰竭而烦躁，肌肉萎缩，下肢浮肿（俗称脚气病）等症状。

维生素 B_1 还可抑制乙酰胆碱酯酶的活性，使神经正常传导所需的乙酰胆碱能以适当的分解代谢速度而维持一定浓度，以保证神经传导的正常功能。

缺少维生素 B_1 还会引起肠胃蠕动缓慢，消化液分泌减少、食欲不振和消化不良等病症。所以在临床上往往将其作为B_1缺乏症的辅助药物，用于治疗神经炎和中枢神经系统损伤和肠胃功能障碍等。近年来，开拓了一种新 B_1，它是呋喃硫胺，其化学结构为

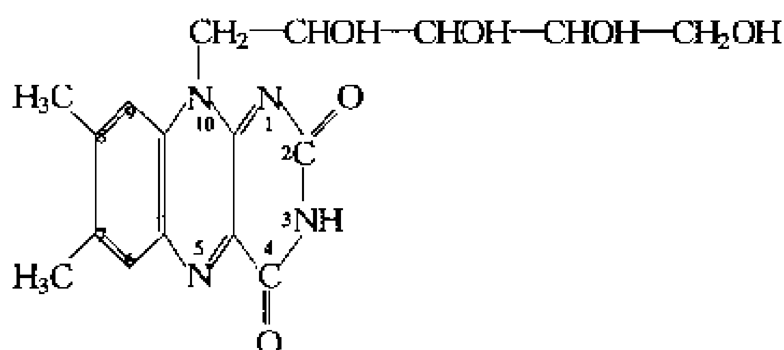


它在体内不会被硫胺酶破坏,因而药效持久。

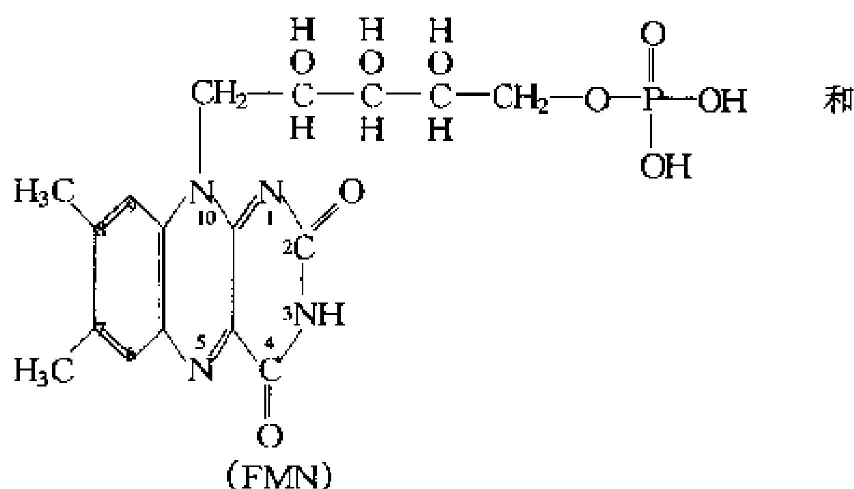
维生素 B_1 在酸中氧化会生成一种硫色素,它在紫外光下发出蓝色荧光,可用于检测。

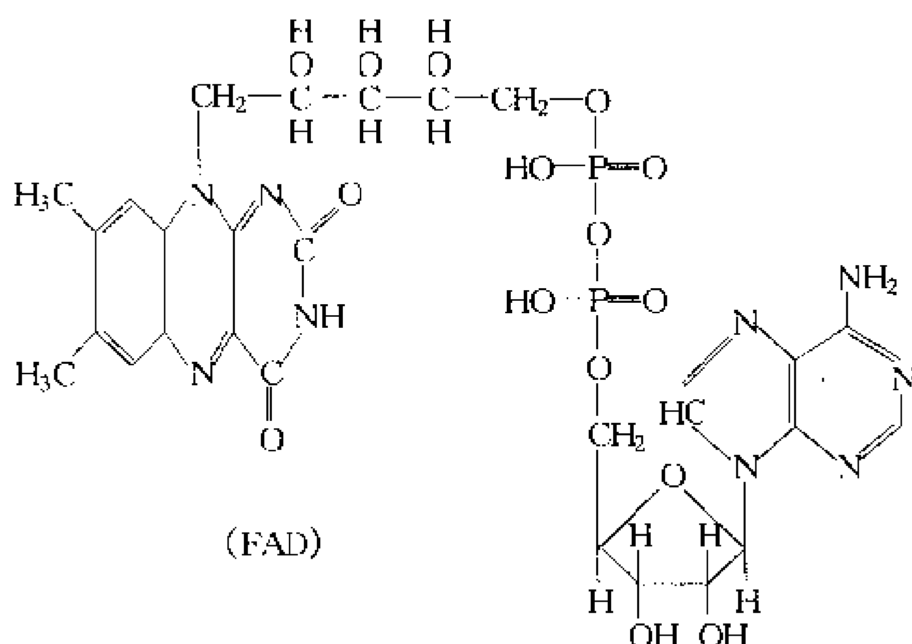
10.2.2 维生素 B_2 和黄素辅酶

维生素 B_2 是核糖醇与 6,7-二甲基异咯嗪构成的黄色化合物,故又称为核黄素,其化学结构如下:



在生物体内 B_2 以黄素单核苷酸(FMN,flavin-mononucleotide)和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD,flavin adenine dinucleotide)的形式存在,它们是多种氧化还原酶(黄素蛋白)的辅酶,一般结合在酶蛋白上不易分开,广泛参与体内各氧化还原反应,成为氢的传递体,促进糖、脂肪、蛋白质代谢。从以下化学结构式




(FAD)

来看,它们的共同特点是在分子中异咯嗪环上5位和1位具有结合氢和传递氢的活性氮原子,在生物氧化过程中可以加氢和脱氢,充当将氢从底物转移给受体的传递体:

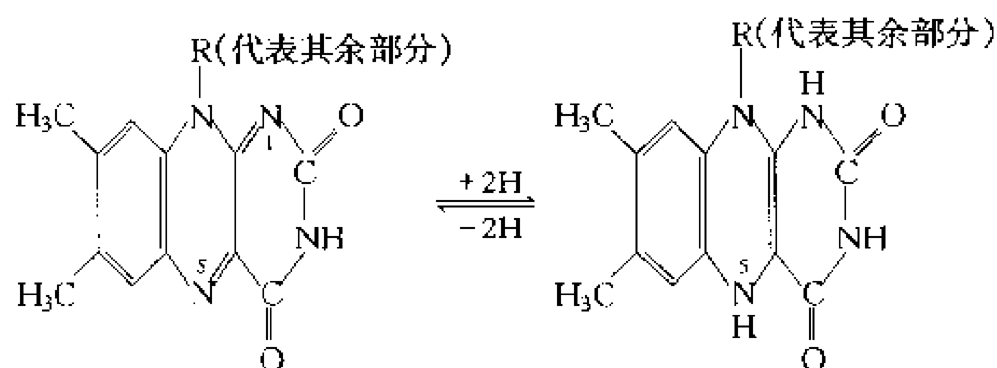


表10-1列举了以FAD和FMN为辅酶的一些酶及其催化的反应,表明维生素B_2的主要生理功能是以辅酶角色参与生物氧化作用。B_2缺乏时,将使一些代谢减慢或发生障碍,从而组织呼吸减弱,导致皮肤、粘膜等发炎,视觉模糊。人类初起的主要病症是唇炎、舌炎、口角炎、眼角膜炎等。

表 10-1　以 FAD 和 FMN 为辅酶的一些酶催化反应例

酶	辅　酶	底　　物	产　　物
D-氨基酸氧化酶	FAD	D-氨基酸	α-酮酸
NAD^+-细胞色素还原酶	FAD	NADH	NAD^+
羟基乙酸氧化酶	FMN	羟基乙酸	乙醛酸
琥珀酸脱氢酶	FAD	琥珀酸	反丁烯二酸
α-磷酸甘油脱氢酶	FAD	3-磷酸甘油	磷酸二羟丙酮
酰基辅酶 A 脱氢酶(C_6-C_{12})	FAD	酰基辅酶 A	烯脂酰辅酶 A

动物必须从食物摄取 B_2，成人的需要量为 1.0～2.0mg/天。核黄素在自然界分布很广，小麦、青菜、黄豆、米糠、酵母、蛋黄、动物心肝等含量都较丰富，所以可以从中提取 B_2，也可化学合成。

核黄素在酸中稳定，在碱性稳定性较差。它的水溶液会发出黄绿色荧光，其衍生物（FAD 或 FMN 等）氧化型的吸收光谱特征主峰 λ_{max} = 450nm（伴峰约在 378nm 处，见图 10-1），而它们的还原型（$FADH_2$ 或 $FMNH_2$）是无色的。它们的单电子还原态半醌可以两种型式存在，未解离型是蓝色（λ_{max} = 560nm）而解离型是红色（λ_{max} = 490nm），其中未配对电子在 5 位 N 和 4 位 C 之间离域化，两型式质子解离的 pKa 等于 8.4。

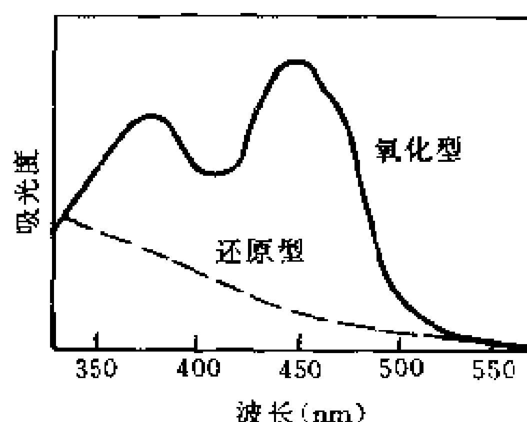
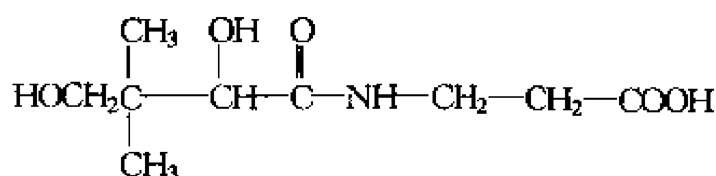


图 10-1　核黄素衍生物吸收光谱

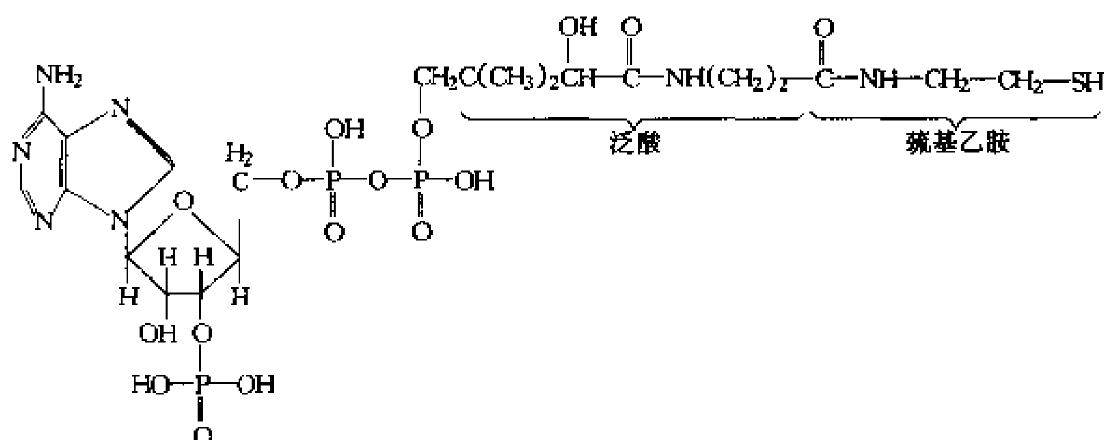
10.2.3　泛酸和辅酶 A 与维生素 PP 及辅酶Ⅰ、Ⅱ

（一）泛酸和辅酶 A

泛酸是 α，γ-二羟-β，β-二甲基丁酸与 β-丙氨酸藉肽键缩合而成的酸性物质，其化学结构是



它的巯基乙胺衍生物是辅酶 A(HSCoA)的主要组成成分，其结构如下：

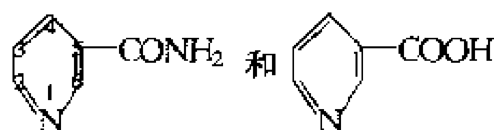


它具有的活泼巯基可以接受或放出酰基而参加酰基转移反应。所以其重要的生理功能是在代谢过程中充作酰基的传递载体，对糖、脂类和蛋白质代谢起着极其重要的作用。

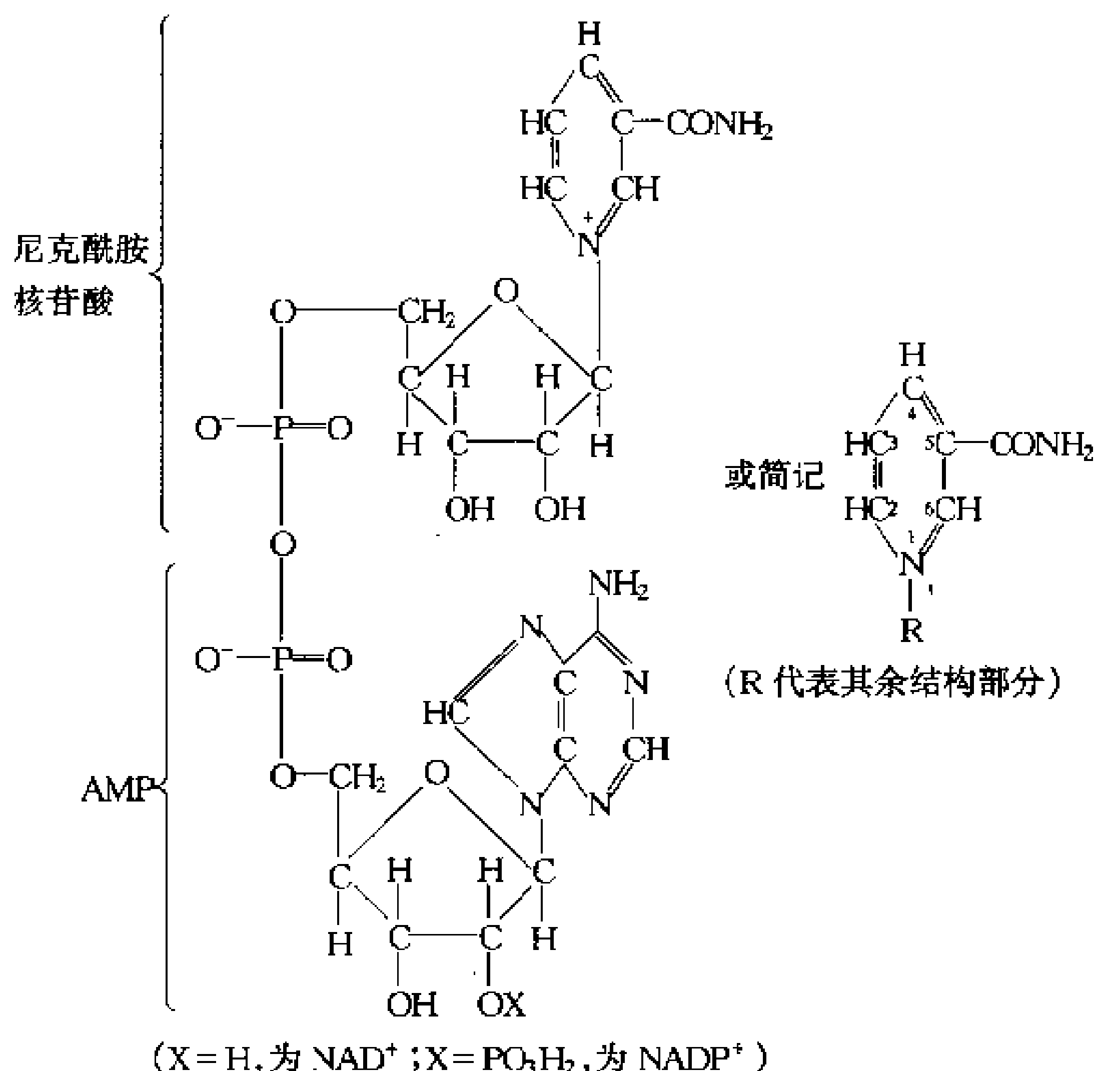
当泛酸不足而引起辅酶 A 缺乏时，糖有氧分解进入三羧酸循环彻底氧化受阻，脂肪酸的 β-氧化受阻，使体内供能不足和影响 ATP 的合成以及脂肪酸积累等，往往引起脂肪肝、贫血、功能性低热、白细胞减少、皮炎，甚至会导致各种肝炎、心肌梗塞等。不过人类食物(蛋、米糠、肝、肾、酵母、蜂王浆)中含量较多，肠内细菌亦能合成泛酸供人体使用，一般很少发生泛酸缺乏病症。

(二)维生素 PP、辅酶Ⅰ和辅酶Ⅱ

维生素 PP 系指两种物质——尼克酸(又名烟酸)和尼克酰胺(又称烟酰胺)。在体内以尼克酰胺为主要形式存在，尼克酸是尼克酰胺的前体，它们的化学结构分别如下：



尼克酰胺是辅酶Ⅰ(NAD^+)和辅酶Ⅱ($NADP^+$)的主要组成成分,详见下式:

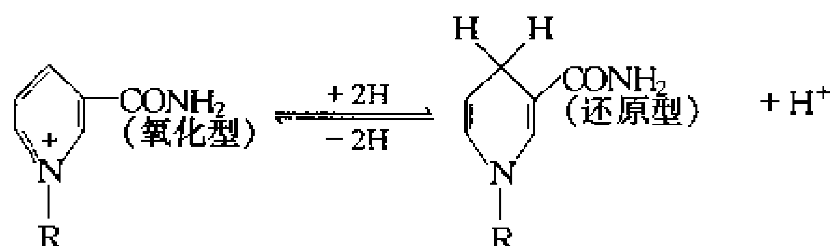


($X=H$,为 NAD^+;$X=PO_3H_2$,为 $NADP^+$)

NAD^+ 和 $NADP^+$ 是多种脱氢酶的辅酶(见表10-2),在生物氧化、氧化磷酸化中发挥极为重要的作用。有些酶需要 NAD^+ 为其辅酶,有些酶需要 $NADP^+$ 作辅酶,还有些酶可以二者中的任一作辅酶。NAD^+ 和 $NADP^+$ 的分子结构特点是都含有尼克酰胺的吡啶环,而环上4位处碳原子在有关酶作用下成为加氢和脱氢的活性部位,并通过它可逆地进行氧化还原,在有关代谢反应中起着传递氢和转移电子的作用,它们的作用和反应式表述如下:

表 10-2　以 NAD^+ 或 $NADP^+$ 为辅酶的酶举例

酶	辅　酶	底　物	产　物
醇脱氢酶	NAD^+	乙醇	乙醛
异柠檬酸脱氢酶	NAD^+，$NADP^+$	异柠檬酸	α-酮戊二酸，CO_2
磷酸甘油脱氢酶	NAD^+	α-磷酸甘油	磷酸二羟丙酮
乳酸脱氢酶	NAD^+	乳酸	丙酮酸
3-磷酸甘油醛脱氢酶	NAD^+	3-磷酸甘油醛	1,3-二磷酸甘油酸
6-磷酸葡萄糖脱氢酶	$NADP^+$	6-磷酸葡萄糖	6-磷酸葡萄糖酸
谷氨酸脱氢酶	NAD^+，$NADP^+$	L-谷氨酸	α-酮戊二酸，NH_4^+
谷胱甘肽还原酶	NADPH	氧化型谷胱甘肽	还原型谷胱甘肽
苹果酸脱氢酶	NAD^-	苹果酸	草酰乙酸
硝酸还原酶	NADP	硝酸盐	亚硝酸盐



尼克酰胺核苷酸辅酶的氧化型和还原型有不同的光学特征，还原型在 260nm 和 340nm 均有吸收峰，而氧化型无 340nm 吸收峰。如果 260nm 或 340nm 光激发还原型和氧化型时，还原型在 460nm 发出蓝白色荧光，而氧化型却没有。

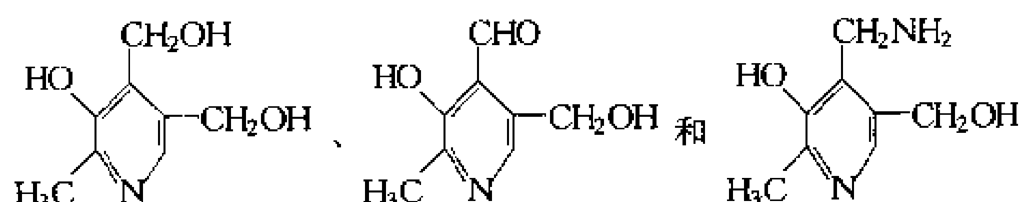
例如，乙醇在醇脱氢酶的作用下脱氢氧化成乙醛，底物乙醇分子的 1 个 H^+ 和 2 个电子转给尼克酰胺的吡啶环上，使氮原子由五价变为三价，而 4 位碳原子上添加了一个氢原子，底物的另一个氢原子以 H^+ 方式释放至溶液中，于是 NAD^+ 氧化型转变成 NADH 还原型。它们又可在其它的脱氢酶（如乳酸脱氢酶）的作用下，将得来的氢传递给另一底物（如丙酮酸）本身恢复成氧化型的 NAD^+。

作为辅酶Ⅰ和Ⅱ的 NAD^+ 和 $NADP^+$，它们与有关酶蛋白的结合较松动，易脱离下来而单独存在。自然界中分布很广，肉类、谷物及花生中含量丰富。但玉米中缺乏尼克酸(或体内尼克酸前体色氨酸)。成人需要量是 10～18mg/天。如果体内长期缺少维生素 PP 会引起神经性皮炎的癞皮病症。长期服用异烟肼(isoniazjde，INH)者，必须适当补充维生素 PP。

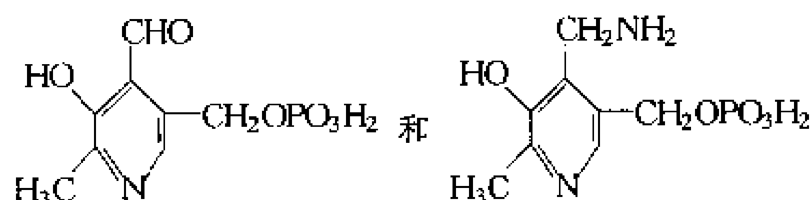
对于泛酸和尼克酸的药名曾经都用过维生素 B_5 的称呼，故建议分别沿用维生素 B_3 和 B_5 予以纠正，避免混淆。

10.2.4 维生素 B_6 和磷酸吡哆醛

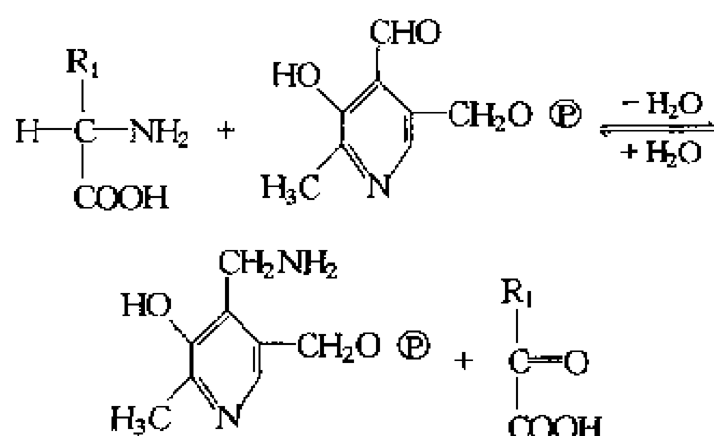
维生素 B_6 是吡哆醇、吡哆醛和吡哆胺三种物质的混合物，它们的化学结构分别为



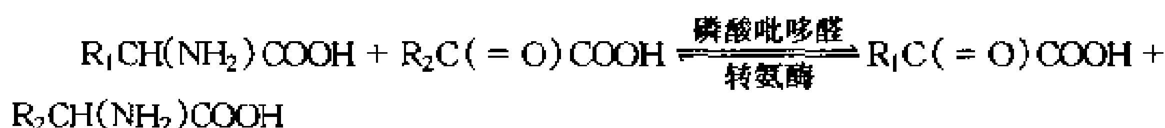
在体内这三种物质可以互相转变，并经磷酸化作用变成相应的磷酯存在，它们之间也可相互转变。作为辅酶参加有关酶催化代谢过程的主要是磷酸吡哆醛和磷酸吡哆胺，它们的化学结构分别是



磷酸吡哆醛在氨基酸代谢中起着非常重要的作用，在有关酶的催促下分子上的醛基团成为转氨的活性位，因此它是氨基酸转氨作用(由此也能起脱羧作用或消旋作用)的辅酶。例如，在转氨酶的催化下，磷酸吡哆醛可作为氨基的传递载体，参与氨基酸和 α-酮酸的转氨过程，即

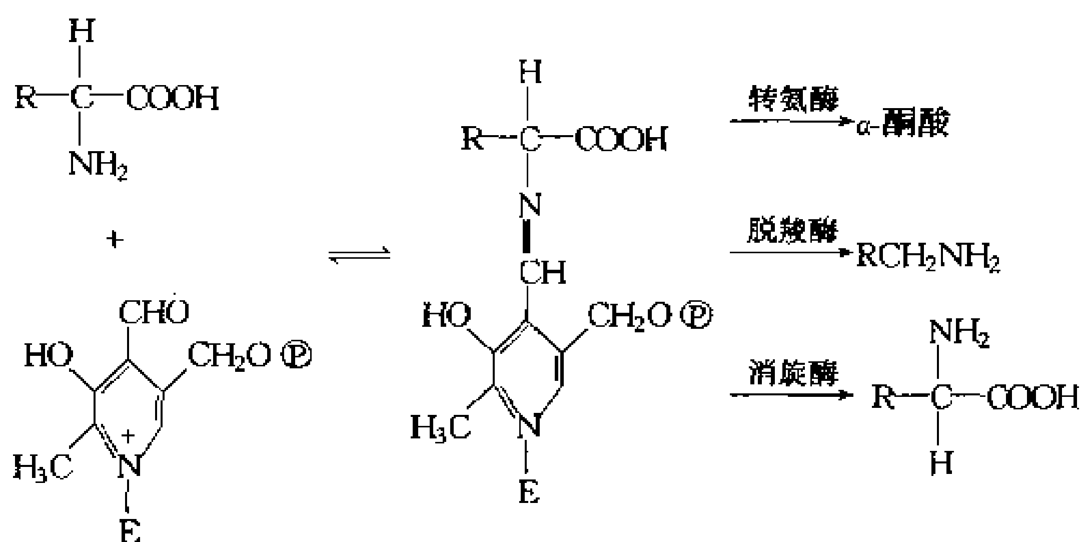


如果有多余 α-酮酸[$R_2C(=O)COOH$]存在时,上述反应所产生的磷酸吡哆胺可按上式逆反应将多余 α-酮酸转变成相应的 α-氨基酸[$R_2CH(NH_2)COOH$],磷酸吡哆胺在传递出氨基后,又转为磷酸吡哆醛,其总反应是



$$R_1CH(NH_2)COOH + R_2C(=O)COOH \xrightleftharpoons[\text{转氨酶}]{\text{磷酸吡哆醛}} R_1C(=O)COOH + R_2CH(NH_2)COOH$$

结合有关酶(E)的磷酸吡哆醛上活性醛基可与底物 α-氨基酸的氨基结合而成一种复合物,归属于 Schiff 碱,它是一种名为醛亚胺的过渡态。它能根据结合的转氨酶催化特性,使氨基酸发生转氨反应,也可按结合的脱羧酶催化特性,使 α-氨基酸脱羧,还可在结合的消旋酶作用下起消旋作用:



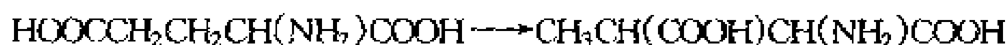
根据上述机制，磷酸吡哆醛可以成为谷氨酸脱羧酶的辅酶，有利于形成 γ-氨基丁酸而对中枢神经可能有抑制调节作用。往往作为辅助药物用于镇静婴儿惊厥和孕妇呕吐等，维生素 B_6 还对皮肤创伤的修补愈合的细胞生长大有裨益。缺少维生素 B_6 会引起脂漏性皮肤炎，长期服用异烟肼者，还可能引起吡哆醛与异烟肼反应而生成异烟腙，使 γ-氨基丁酸的生成减少，导致神经系统中毒而引起不安、失眠等病状，所以在补充维生素 PP 的同时，还需补充维生素 B_6。

维生素 B_6 在动植物中分布很广，酵母、肝、蛋黄、肉、鱼和谷物中含量均很多，肠道细菌也可合成维生素 B_6 供应人体，故一般人类很少发生缺乏维生素 B_6 的疾病。

10.2.5 维生素 B_{12} 和 B_{12} 辅酶

维生素 B_{12} 分子含有金属钴，结构十分复杂（可参阅有关生物化学专著），由钴、5,6-二甲基苯并咪唑、咕啉（corrin ring）、3′-磷酸核糖、氨基丙醇等成分构成，又称为钴胺素（cyanocobalamin）。钴位于咕啉环的中央，还可再与不同的基团结合而形成不同的维生素 B_{12}，主要的有 5′-脱氧腺苷钴胺素、氰钴胺素、羟钴胺素和甲基钴胺素等，见图 10-2，其中 5′-脱氧腺苷钴氨素是维生素 B_{12} 在体内的主要存在形式，被称作 B_{12} 辅酶。络合的钴成为 B_{12} 辅酶的活性部位。

5′-脱氧腺苷钴胺素是几种变位酶的辅酶。例如它参与甲基天冬氨酸变位酶催化谷氨酸分子中羧基的转位而变成甲基天冬氨酸；它也参与甲基丙二酰辅酶 A 变位酶催化甲基丙二酰酶 A 中的 $-CH_3$ 转移反应：



$$HOOCCH_2CH_2CH(NH_2)COOH \longrightarrow CH_3CH(COOH)CH(NH_2)COOH$$



$$HOOCCH(CH_3)COSC_oA \longrightarrow HOOCCH_2CH_2COSC_oA\text{（琥珀酰辅酶 A）}$$

它又是四氢叶酸（FH_4）转甲基酶的辅酶，对 dTMP 的生物合成起着重要作用，而且还对乙酰胆碱及卵磷脂组成成分胆碱的生物合成起着辅酶作用。

甲基钴胺素是参与转甲基作用的辅酶，例如在高半胱氨酸转变

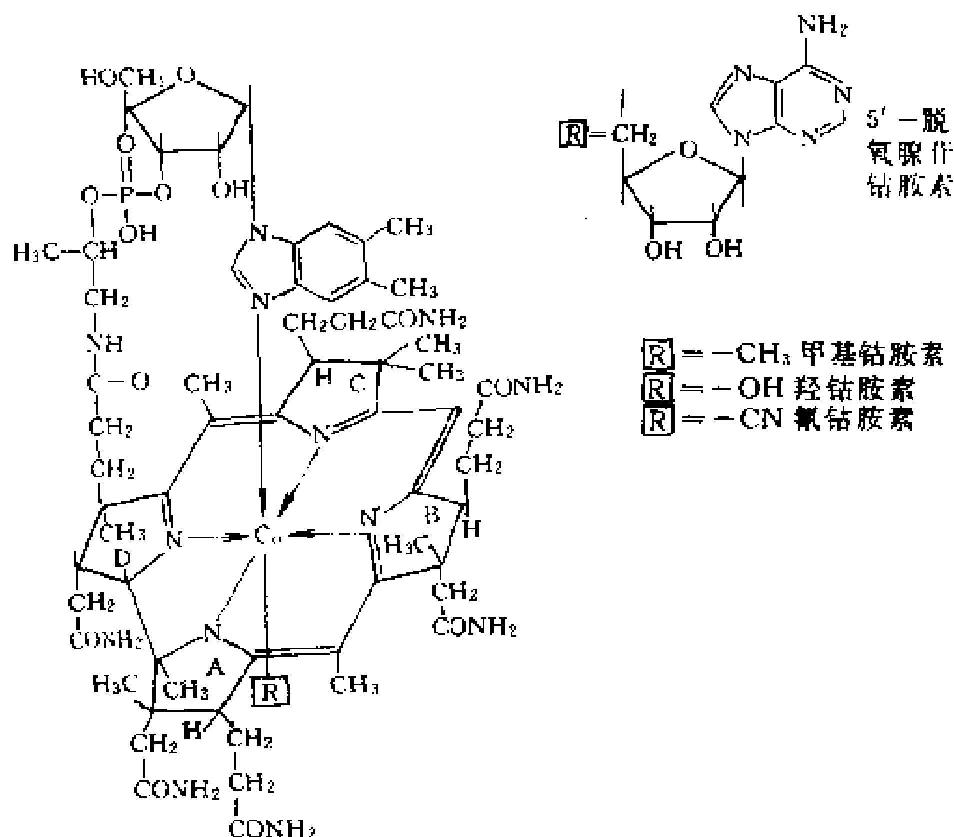
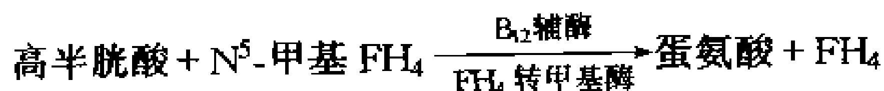


图 10-2　维生素 B_{12}的化学结构

为蛋氨酸的过程中起着传递甲基的作用。



$$\text{高半胱酸} + N^5\text{-甲基 } FH_4 \xrightarrow[FH_4\text{ 转甲基酶}]{B_{12}\text{辅酶}} \text{蛋氨酸} + FH_4$$

维生素 B_{12}还参与体内一碳单位的代谢，因此维生素 B_{12}常与叶酸的作用关联。

维生素 B_{12}的缺乏会引起许多代谢反应失常，即引起巨红细胞 DNA 合成受阻，影响细胞分裂和分化为成熟细胞而出现巨红细胞性贫血（恶性贫血）。此外，也会引起神经炎、神经萎缩、弱视及脂肪肝等疾患。

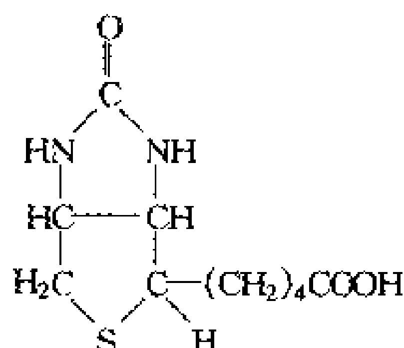
维生素 B_{12}在一些食物中，如肝、肉、鱼、蛋等的含量都较为丰富，人类肠道细菌也可合成维生素 B_{12}，在一般情况下不应缺乏。不过，它只有在与胃粘膜分泌的一种称为“内在因子”的糖蛋白结合后，才

能透过肠壁被吸收。倘若有人缺乏"内在因子",就可能导致维生素 B_{12}的缺乏症,必须注射 B_{12}治疗。

10.2.6 生物素和叶酸及其辅酶

(一)生物素

生物素是带有戊酸侧链的噻吩环和尿素结合而成的骈环衍生物,其化学结构为



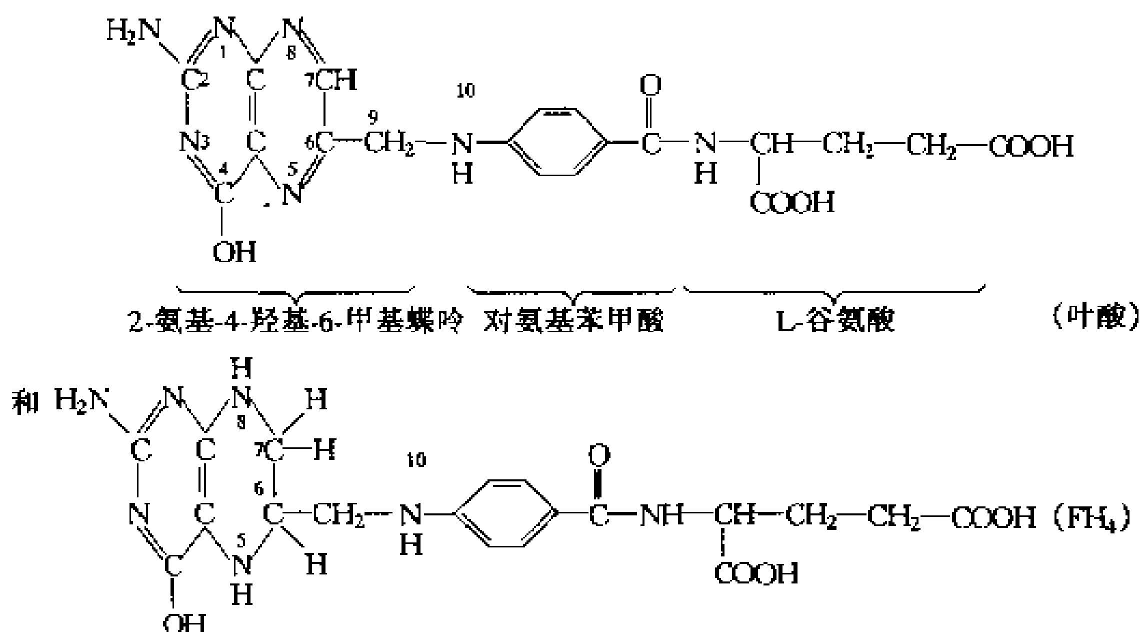
它是多种羧化酶的辅酶。生物素的羧基与其专一的酶蛋白中赖氨酸的 ε-氨基以酰键相连,使生物中尿素环上的一个氮原子活化,能够与 CO_2 结合,并将此 CO_2 转移给适当的受体。于是生物素便在代谢过程中起着转移 CO_2 的载体作用。因此生物素可参与 CO_2 的固定,与糖、脂肪、蛋白质及核酸代谢都有密切关系。

生物素在动植物组织中分布较广,肝、肾、蛋黄、酵母、蔬菜、谷物等均含有,肠道细菌也能合成,在通常情况下不容易发生生物素缺乏症状。如果摄入大量生蛋白,由于蛋清含有一种抗生素蛋白能和生物素结合导致不能被肠壁吸收,或者长期服用抗菌素杀伤了能合成生物素的有益寄生细菌,或者氧化使其丧失生理活性,都有可能产生生物素缺乏症状,呈现出疲乏贫血,鳞屑状皮炎,不过,可以注射生物素进行治疗。

(二)叶酸

叶酸分子是由蝶呤、对氨基苯甲酸和 L-谷氨酸结合组成的,在自然界广泛存在,特别在绿叶中含量丰富。它在体内以四氢叶酸(FH_4 或 THFA)的形式作为转甲基或亚甲基、转甲酰基、转羟甲基及

转氨甲酰基的辅酶，它们的结构式分别为



总而言之，5,6,7,8-四氢叶酸为转移一碳基团酶系的辅酶，在有关酶的作用下5位及10位氮原子具有参与转移相关一碳基团的活性。对于甲基($-CH_3$)或氨甲酰基($-CH=NH$)是由5位氮作传递活性位；对于亚甲基($-CH_2-$)或甲川基($=CH-$)由5位氮和10位氮协同成为活性位，可形成中间过渡态 $N^5—CH_2—N^{10}$ 和 $^+N^5=CH—N^{10}$。从而四氢叶酸在代谢中起着重要作用，其主要的生理功能举例如下：

(1)N^5,N^{10}-亚甲基四氢叶酸充当亚甲基的转移载体，在有关酶的作用下，使甘氨酸变成丝氨酸，或通过亚甲基的转移，使尿苷酸变为胸苷酸。

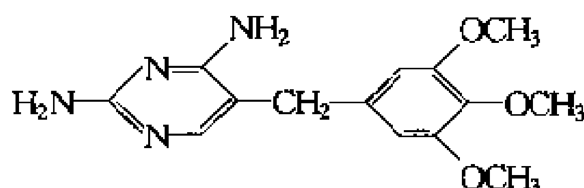
(2)N^{10}-甲酰四氢叶酸在转甲酰酶作用下，充当甲酰基的转移载体，为合成嘌呤环提供环中2位的碳。

(3)N^5-甲基四氢叶酸在转甲基酶作用下，使高半胱氨酸变为蛋氨酸。

由于叶酸在合成嘌呤和嘧啶过程中都起着建环的重要作用，也就对蛋白质的生物合成有着密切的影响。因此，叶酸对正常红细胞的形成、发育、成熟和白细胞的成熟有促进作用。叶酸在绿叶和酵母

中含量较丰富，人的肠道细菌也能合成，通常很少发现叶酸缺乏症，但是，代谢失常、组织需要量增得很大或偏食、或长期使用磺胺类肠道抗菌药物时就有可能引起叶酸缺乏，导致出现巨红细胞性贫血，多分叶白细胞发育与成熟受阻。叶酸在酸中不稳定易受光破坏；食物在室温中保存过久，叶酸也往往易损失而造成缺乏。

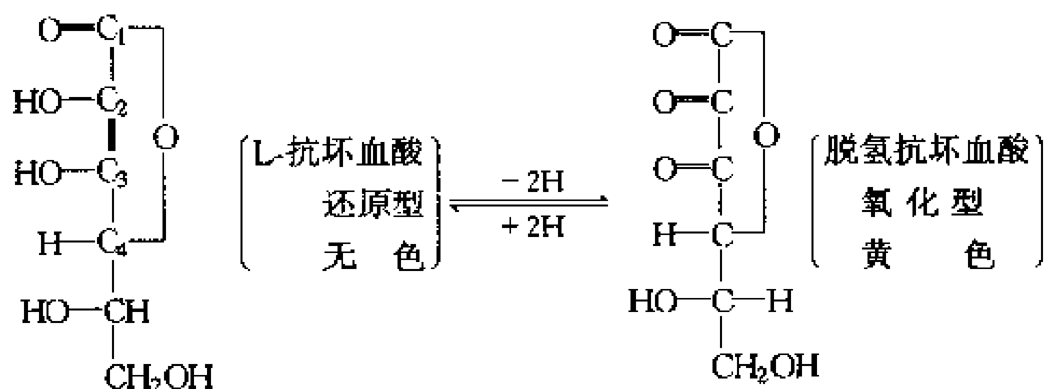
四氢叶酸作为辅酶参与转移一碳基团反应后所形成的二氢叶酸（FH_2），必须于 NADPH 和维生素 C 存在条件下，由 FH_2 还原酶催化重新转化为 FH_4 后才能再参加有关转移反应。为了抑制细菌的生长和肿瘤的发展而干扰核酸的代谢，人们设计制造了磺胺药（利用它与对氨基苯甲酸相似性）、氨基喋呤（以 $-NH_2$ 代替 4 位的 $-OH$）、氨甲喋呤（除 4 位是 $-NH_2$ 外，以 $-CH_3$ 代替 10 位的氢）和甲氧苄氨嘧啶（TMP）



它们能竞争地和 FH_2 还原酶的活性中心结合，抑制 FH_2 变回 FH_4。有阻碍核糖核酸和脱氧核糖核酸合成的作用，适用于各种急性白血病、肿瘤和癌等的治疗。

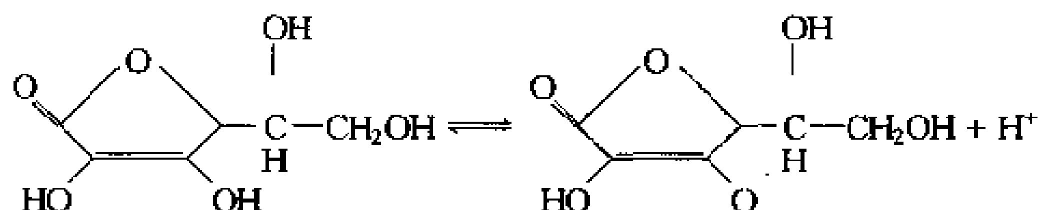
10.2.7 维生素 C

维生素 C 又名抗坏血酸，它是一种具有六个碳原子不饱和酸性多羟化合物，以内酯形式存在，它具有强的还原性，2 位和 3 位碳原子的烯醇羟基容易脱氢形成醌式而发黄，化学结构式变化如下：



于是维生素 C 具有强的还原性，可能是主要通过其可逆的氧化还原特点在生理功能上表现为辅酶。因此，有人认为维生素 C 也参与了机体的振荡效应。

处于 2 位与 3 位碳原子的烯醇式羟基上的氢易解离而释放 H^+，致使维生素 C 呈酸性，即



根据 4 位碳与 5 位碳处构型的不对称性，抗坏血酸有 D 型与 L 型两种，只有 L 型有生理活性。它所参与的生理代谢反应例子很多。

(1)通过本身的氧化和还原，在生物氧化还原过程中作为氢的转移载体。例如，维生素 C 在 FH_2 还原酶的催化下，可参与氧化型 FH_2 的还原，促使生理活性 FH_4 的形成。

(2)抗坏血酸可充当脯氨酸羟化酶的辅酶，促进羟脯氨酸、羟赖氨酸等的合成。它们的存在对维持胶蛋白的正常构象有着十分重要的作用。缺乏维生素 C，胶原蛋白的合成受到影响，造成血管基底膜胶原蛋白不足，细胞间隙增大，毛细血管出血。

(3)已知许多巯基的酶，在体内以 -SH 基存在才能发挥其催化活性，而抗坏血酸以其活泼的还原性能可使这些酶分子的巯基处于还原状态，从而保证它们的催化活性。以抗坏血酸能和谷胱甘肽(GSH)协同建立一种重要的氧化还原偶体系为例：

(A)在 GSH 还原酶和 GSH 过氧化酶催化下，维生素 C 能使脂性过氧化物还原，避免该过氧化物毒性对细胞质膜的破坏和影响。



还原型维生素 C + GSSG $\xrightarrow{\text{谷胱甘肽还原酶}}$ 氧化型维生素 C + 2GSH

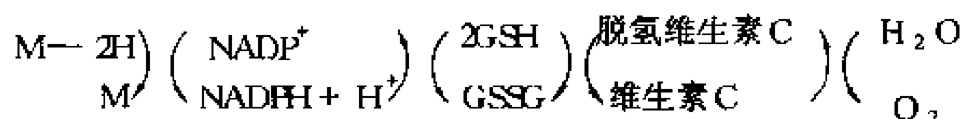


2GSH + 脂性过氧化物 $\xrightarrow{\text{谷胱甘肽过氧化酶}}$ GSSG + 不饱和脂肪酸

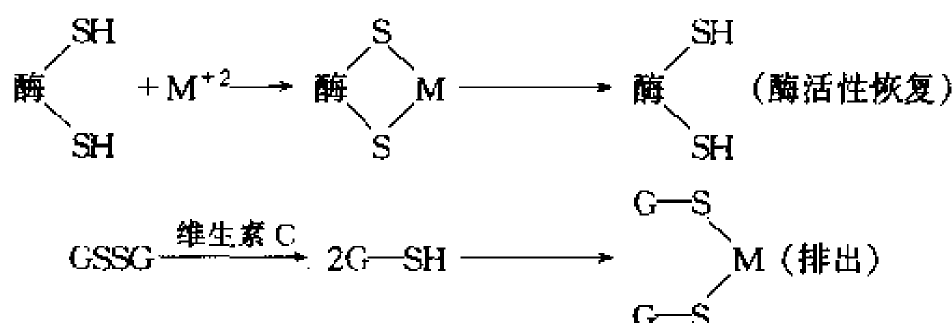
(B)维生素 C 还在 NADH-高铁血红蛋白还原酶缺乏的情况下，直接还原红细胞内的高铁血红蛋白成为正常的血红蛋白，氧化型的

维生素 C 又被 GSH 还原再生。

(C)在植物体内维生素 C 还能与 GSH 和 $NADP^+$ 变化相偶联，建立特殊的传递氢链和呼吸途径，即



(D)维生素 C 有可使被重金属、砷化物、铅化物、苯、细菌代谢的毒物等中毒的巯基酶恢复 -SH 状态而解毒复活的功能，即



(4)抗坏血酸还有许多其它的生理功能，例如作为羟化酶的辅助因子维生素 C 也和胆固醇的排出、一些激素的形成有关；还和儿茶酚胺类、5-羟色胺等的生成有关，这对调节神经功能有一定作用；它又能还原多巴醌而消除皮肤上因紫外光照射和氧化后产生多巴醌所引起的色斑。

维生素 C 广泛存在于新鲜水果、蔬菜等之中，人类必须通过食物获得。如果腹泻、胃肠炎、消化道溃疡或肠手术等，可能会出现维生素 C 缺乏情况而产生坏血病等，其症状为创口溃疡不易愈合；骨骼和牙齿易断裂或脱落，毛细血管通透性增大，皮下、粘膜、肌肉出血、甚至内脏或普遍出血等。

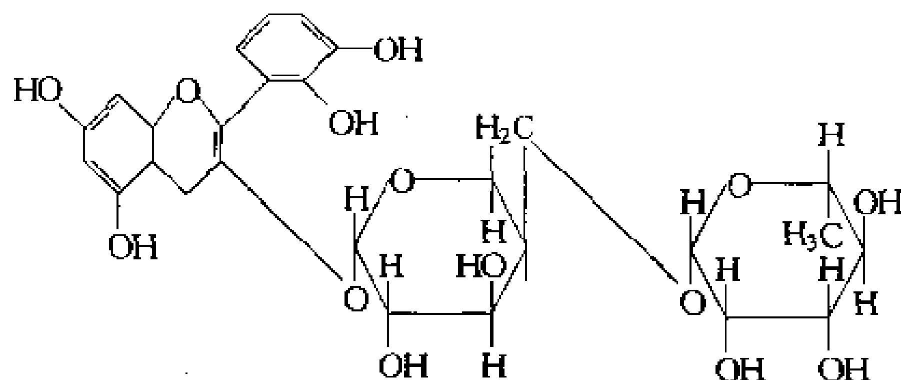
由于抗坏血酸 2 位和 3 位碳上羟基活泼，在空气中见光很容易氧化，此外如加热、Ca^{2+} 和 Fe^{2+} 的混入都可能引起它的变质。

10.2.8 其它水溶性"维生素"

"维生素 P"、"维生素 U"和"维生素 B_{15}"均属于药理性物质，曾被某些学者列为维生素类。

(一)"维生素 P"

它是一种脱氢黄素酮的糖苷类物质，例如柠檬素(limonin)、芸香苷(又称芦丁，rutin)，它们在化学结构上大同小异，芦丁的结构为

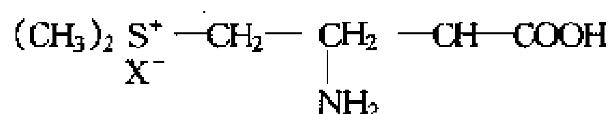


"维生素 P"在体内可能作为氢载体，参与氧化还原反应，具有增强维生素 C 的功能和降低毛细血管透性的作用，还对维生素在体内积累和降低血压有益处。

食物中往往同时含有"维生素 P"和维生素 C，在功能的作用上相互协同，人们常将它们制成复方片，防治紫癜、视网膜出血等疾症。

(二)"维生素 U"

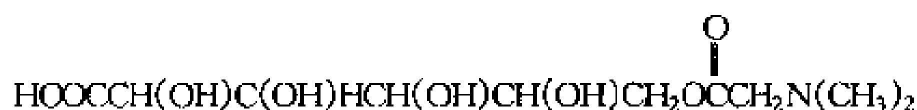
它是一种存在于蔬菜中含硫的 α-氨基酸衍生物，相似于甲硫氨酸。它的功能是充当溃疡因子，在体内的存在有助于胃粘膜的再生和溃疡的愈合，人们常用卤素($X^- = I^-$ 或 Cl^-)取代的甲硫氨酸代替"维生素 U"，它用以防治消化道溃疡，其结构为



若"维生素 U"缺乏时可造成动物消化道溃疡。

(三)"维生素 B_{15}"

"维生素 B_{15}"是二甲氨乙酰基葡萄糖酸酯，其结构为



"维生素 B_{15}"及其衍生物在体内的功能可能是作为甲基供体，参与胆碱、肌酸、肾上腺素的合成。人们利用它的多甲基衍生物以治疗冠心

病、也用于抗脂肪肝和解毒。

10.3 脂溶性维生素

这类维生素仅溶于脂溶剂，不溶于水，只有与脂类油剂共食才有助于吸收，吸收后可在体内贮存。但这和肠道吸收脂类的能力有关，肠道疾病都有可能发生此类维生素吸收的障碍，导致伴生相应的维生素缺乏症。

10.3.1 维生素 A

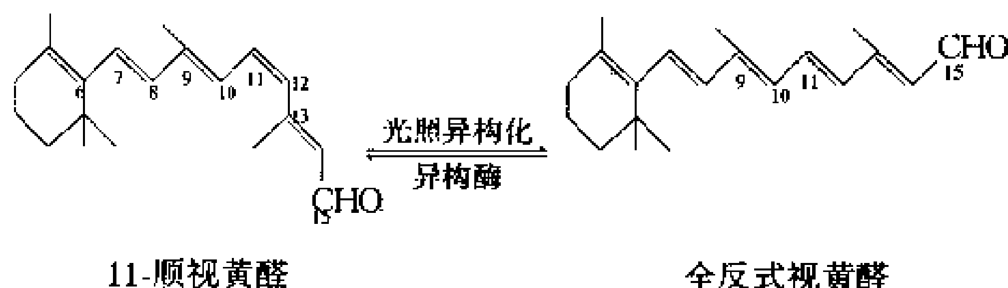
维生素 A 是一种由六碳环和二个异戊二烯分子连接起来的不饱和一元醇，仅存在于动物中，鱼肝油中含量较多。蔬菜和植物中如胡萝卜、蕃茄、菠菜和枸杞等均含有 β-胡萝卜素(β-carotene)，β-胡萝卡素在动物小肠内经酶催化可转为维生素 A。已知维生素 A 有两种：视黄醇(A_1，retionol)和 3-脱氢视黄醇(A_2)。它们的化学结构式分别为

CH₂OH 和 CH₂OH

它们的区别在于 3-脱氢视黄醇的脂环 3 位上多了一个双键。A_1 活性较高，主要存在于海水鱼的肝脏中，其次存在于其它动物的肝脏、眼球、乳汁和血液中，A_2 则仅发现于淡水鱼内。小肠粘膜中的 β-胡萝卜素-15，15′-双加氧酶可催化 β-胡萝卜素加氧分裂生成 2 个维生素 A_1 分子

$\xrightarrow{+O_2}$ 2 CH₂OH

视黄醇(A_1)在体内可被氧化成视黄醛(retinene),它有6种异构体,但只有9-,11-顺视黄醛会产生暗视觉效应,11-顺视黄醛可在光的照射下产生异构化,变为全反型,其结构变化如下:



11-顺视黄醛　　　　全反式视黄醛

视黄醛的醛基能与视蛋白内赖氨酸的ε-氨基以形成schiff碱而结合成视紫红质(rhodopsin),参与暗视觉过程。人们已知在眼球视网膜上有两类细胞:(1)锥体细胞,它在强光下接受不同波长的可见光刺激而产生视觉和颜色反应;(2)杆状细胞,它对弱光敏感,能产生暗视觉,因为它含有视紫红质感光物质,眼睛对弱光的感光性取决于视紫红质的浓度。

9-,11-顺视黄醛在感觉暗光后,通过杆状细胞外侧的ATP酶的作用,提供了能量作化学功而与视蛋白结合产生暗视觉。视紫红质经光照后,顺视黄醛异构化变成全反型构象,与视蛋白高级结构不再契合而二者解离,此时弱光激发的电子传递信号受阻,眼睛在暗处不再产生暗视觉。强光照射停止后,解离的全反型视黄醛可在异构酶的作用下逐渐再生为11-顺视黄醛以恢复视紫红质,这种再生恢复过程,人们称之为暗适应过程。在正常情况下适应开始约4~5min,完全适应约需20~30min。

全反型视黄醛可在脱氢酶和NADH作用下变为全反型维生素A。维生素A易被氧化,遇热和光照会被破坏,需要避光冷藏保存。

如果维生素A缺乏,暗反应时间就会延长,或感受弱光发生障碍,甚至完全丧失暗适应能力,导致夜盲症(night blindness)。维生素A可用于治疗此种病症。

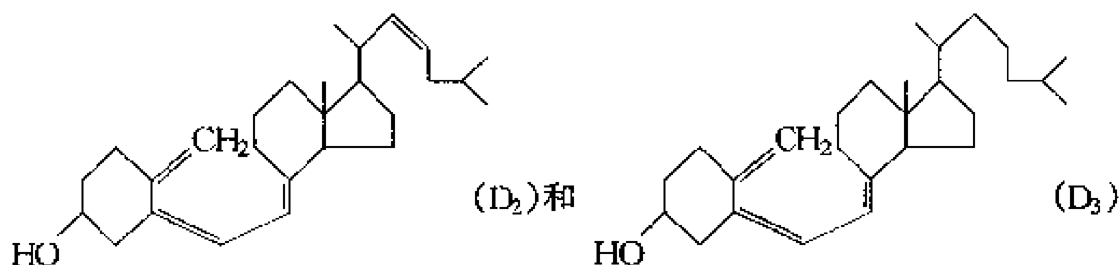
维生素A的另一重要生理功能是维护上皮组织的正常结构与

功能，促进正常的生长发育，其机理尚不清楚。从临床观察而言，维生素A缺乏时，常会出现上皮干燥瘙痒、增生和角质化，产生所谓蛇皮症；对眼、消化道、呼吸道及生殖泌尿系统的上皮组织的影响特别显著，例如泪腺萎缩、分泌减少，角膜或结膜会干燥与发炎，甚至产生干眼病。此外，还可能引起生殖机能减退、骨骼形成受阻。

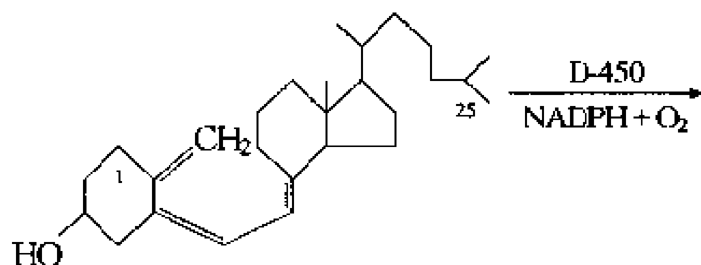
然而，维生素A过量摄取也可能引起中毒，症状为烦躁、恶心、厌食、嗜睡、毛发枯涩易脱，往往皮肤干燥瘙痒，甚至引起肝脏细胞不可逆硬化。

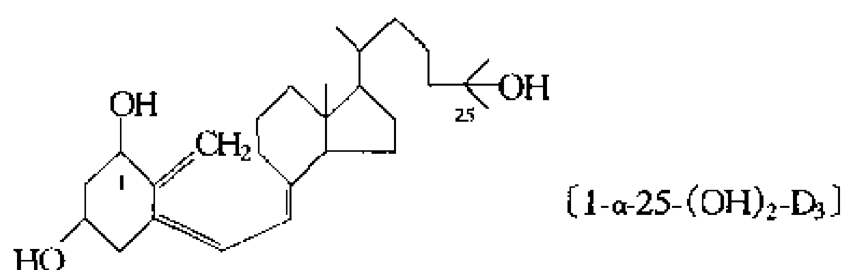
10.3.2 维生素D

维生素D是一类固醇衍生物，有几种的总称，其中以D_2和D_3较重要，D_2和D_3的结构相似，可分别从胆固醇和麦角固醇转化生成，它们的化学结构分别是



在体内主要是D_3发挥出生理功能，但必须先转变为极性的1，25-二羟维生素D_3〔$1\text{-}\alpha\text{-}25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$〕方能表现活性的生理功能。





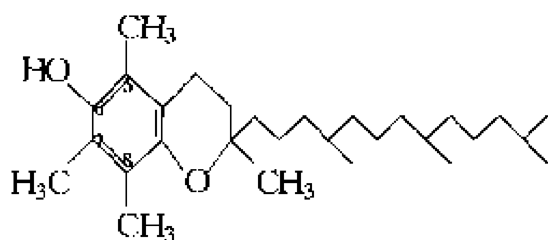
$[1\text{-}\alpha\text{-}25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3]$

$1\text{-}\alpha\text{-}25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$ 能经血液转运至小肠粘膜细胞，并借助于结合因子(Binding factor，BF)转入细胞核，促进对 Ca^{2+} 具有专一性高度亲和力的钙结合蛋白(Ca-BP)的转录合成，Ca-BP 的相对分子质量约25000，含大量二羧基氨基酸，能以 1 比 4 分子与 Ca 结合，从而有效地促进钙的吸收。同时 $1\text{-}\alpha\text{-}25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$ 在小肠中也促进了对磷酸的吸收，有利于骨钙化。因此，D_2 又称为麦角钙化甾醇，D_3 又称为胆钙化甾醇，将维生素 D 通称为抗佝偻病维生素。

人可从动物的肝、蛋、奶和鱼肝油等中摄取维生素 D_3，也可由体内胆固醇转变成 7-脱氢胆固醇，再经日光照射将皮肤中含有的 7-脱氢胆固醇转化为 D_3。植物性食物中所含的麦角固醇也可由紫外线照射转变成 D_2。这些供应足以补充机体的需要。如果维生素 D 缺乏主要出现于孕妇和乳幼儿童，或严重肝、肾患病者时，钙磷吸收会受阻而使钙磷代谢失调，导致血钙磷下降而使浓度不能维持正常，造成骨骼、牙等发育不正常，手足抽搐，出现软骨症、佝偻病。通过适量地服用维生素 D 并配合适当的钙剂，可以预防或治疗这类疾症。然而，过量服用维生素 D 也可能会引起中毒，造成血钙过高而异位钙化、动脉硬化、肾功能衰竭等。

10.3.3 维生素 E

维生素 E 又称生育酚，它是一类苯骈二氢吡喃的衍生物，这类物质按照其结构中甲基取代的数目和位置共有八种，其中 α-、β-、γ-和 δ 四种较重要，而 α-生育酚的生理活性最强，其化学结构为



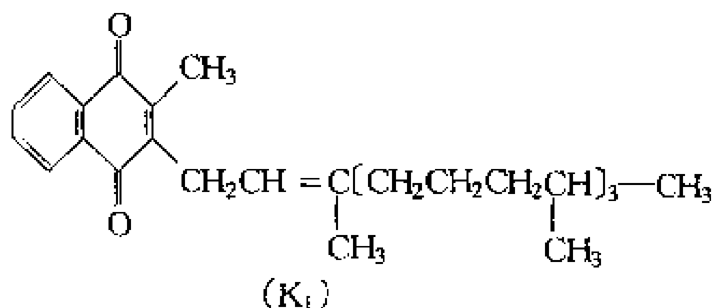
β-生育酚 5 位碳上是甲基($-CH_3$),7 位碳上是 H;γ-生育酚的 5 位碳上是 H,而 7 位碳上是甲基($-CH_3$);δ-生育酚的 5 位和 7 位碳上连接的都是 H。

维生素 E 不仅能促进生殖机能,还因对氧的敏感易被氧化而具有强抗氧化剂的功能,它可能参与氧化磷酸化过程,成为构成生物膜的成分,防止细胞膜中不饱和脂肪酸被氧化破坏,使细胞免受损伤癌变;还能防止红细胞破裂溶血,延长红细胞的寿命,维持循环系统和脑细胞的正常结构和功能。另外,维生素 E 还可保护巯基不被氧化而保持某些酶的活性。总之,维生素 E 的生理功能比较广泛,但这些功能的机理尚不很清楚。

如果缺乏维生素 E 会造成睾丸、胚胎及胎盘等萎缩,引起不育症或流产等。但尚未发现人类缺乏维生素 E 的病症。植物组织中例如麦胚油、玉米油、花生油、豆类和蔬菜等含维生素 E 的量都较丰富,人类可以从中得到足够的 E。即使这样,通常仍用维生素 E 治疗先兆性流产、贫血、保护身体的各种组织结构、美容皮肤等。

10.3.4 维生素 K

维生素 K 是 2-甲基-1,4-萘醌的衍生物,自然界中常见的有 K_1 和 K_2 两种。它们的结构分别是



(K_1)

和 (结构式：2-甲基-1,4-萘醌，3位接 $CH_2[CH=C(CH_3)CH_2CH_2]_5-CH=C(CH_3)-CH_3$)

$$CH_2[CH=\overset{CH_3}{\overset{|}{C}}CH_2CH_2]_5-CH=\overset{CH_3}{\overset{|}{C}}-CH_3$$

(K_2)

它们的主要生理功能是参与肝脏合成凝血酶原，调节凝血因子的合成，促进凝血。因此，又称其为凝血维生素。在促进凝血过程中，维生素 K 充当一种氧化还原酶的辅酶，对凝血酶原肽链中特定的谷氨酸残基羧化生成 γ-羧基谷氨酸残基反应起着应承担的作用，导致产物和 Ca^{2+} 结合后，活化成凝血酶(thrombin)。

此外，维生素 K 还可能以醌形式作为电子传递体系的一部分，参与体内生物氧化、氧化磷酸化过程，发挥其偶联作用而保证能量代谢的正常进行，它也有可能延缓皮质激素在肝内的分解。

维生素 K 在动物肝、蔬菜中含量丰富，一般情况下人们很少出现维生素 K 缺乏症，若胆道梗阻、腹泻或长期使用抗菌素等会引起脂类消化吸收不良时，便有可能产生维生素 K 缺乏的现象，从而引起肌肉或血浆中 ATP 下降和肌肉收缩减弱，甚至发生出血、肝昏迷、阻塞性黄疸等疾患。过去主要使用维生素 K_1 防治，近来有用人工合成的甲萘醌和乙酰甲萘醌。

人们发现维生素 K 的类似物，如双香豆素(dicoumarol)、华法令(warfarin)可作为抗凝血剂，能用于防治血栓形成。

除了上述维生素外，人们有时也把泛醌和硫辛酸归入维生素类。

泛醌是广泛存在于生物线粒体内的醌类物质，它是呼吸链的重要组成成分，其结构是

(结构式：2,3-二甲氧基-5-甲基-1,4-苯醌，6位接侧链)

$$H_3CO,\ H_3CO,\ CH_3;\ -[CH_2CH=\overset{CH_3}{\overset{|}{C}}CH_2]_{7\sim10}H$$

它能通过其醌酚结构的可逆变化而传递电子。

硫辛酸在体内主要的功能是作为 α-酮酸氧化脱羧酶的辅酶，通常和焦磷酸硫胺素协同作用，具有抗脂肪肝、降低血液胆固醇的功能。

10.4 激　素

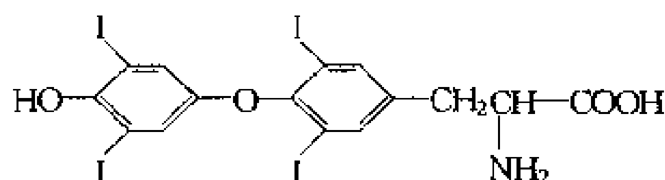
激素，有的是从动物中发现的，有的是在植物中分离出来的，也有的是在具有特殊生长发育规律的昆虫体内取得。根据它们的化学组成特点，大体上可分成 5 种类型：氨基酸衍生物类激素，例如甲状腺激素、肾上腺髓质激素、松果体激素；多肽和蛋白质类激素的有垂体激素、下丘脑激素、甲状腺和甲状旁腺激素、降钙素、胃肠激素等；类固甾醇类激素，例如肾上腺皮质激素、性腺激素、昆虫内激素（蜕皮激素）；脂肪酸衍生物，例如前列腺素、昆虫（性）外激素；其它（苯环或杂环化合物）的有植物激素。

10.4.1　氨基酸衍生物类激素

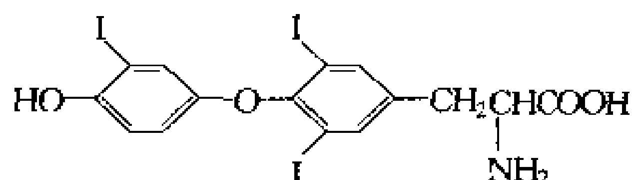
研究得最多的两类是甲状腺激素和肾上腺髓质激素。

（一）甲状腺激素

甲状腺分泌的激素有甲状腺素（thyroxine，T_4）和三碘甲状腺原氨酸（3，5，3′-triiodo thyronine，T_3），化学结构分别为



和



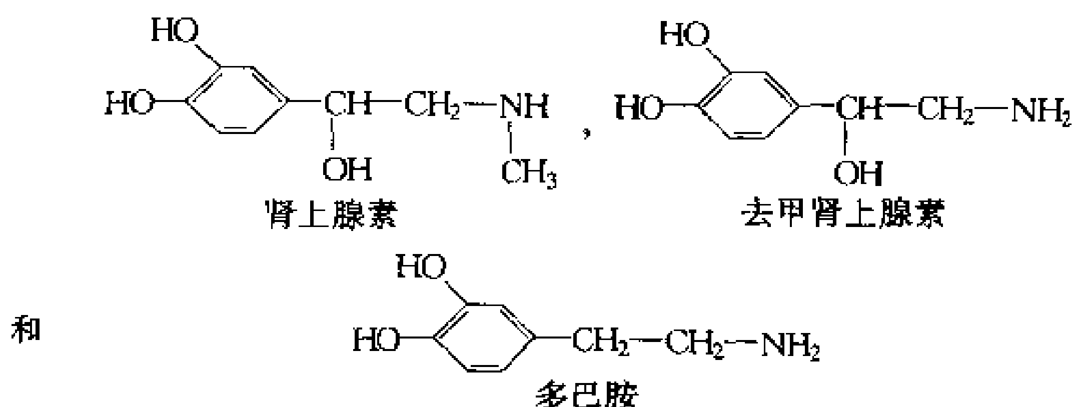
它们都是酪氨酸的衍生物。三碘甲状腺原氨酸的生理活性比甲状腺素强。

甲状腺激素有多种功能,主要的是升高基础代谢,促进生物的生长发育。可能在影响转录、增强 Na^+—K^+—ATP 酶等合成方面起着作用。它的分泌有利于推动糖、蛋白质、脂肪、胆固醇和盐等的代谢。当甲状腺激素大量存在时,还能引起氧化磷酸化解偶联。

甲状腺的机能衰退或亢进都可能导致病变。甲状腺机能衰退甚至切除后,生物的发育迟缓,基础代谢降低,心搏减慢,也会引起生理机能衰退;甲状腺机能亢进或过量服用这类激素后,基础代谢升高,心搏加速,消瘦和过敏。

(二)肾上腺髓质激素

肾上腺髓质分泌的重要激素有二种:主要的是肾上腺素(adrenaline,epinephrine)和含量很少的去甲肾上腺素(或称正肾上腺素,noradre naline,norepinephrine)。这两种激素在交感神经和中枢神经中也有分泌,其中还有多巴胺(dopamine),而且以去甲肾上腺素与多巴胺为主,它们的化学结构分别为

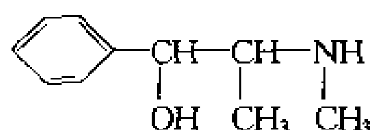


可见,这些激素都是酪氨酸的衍生物,统称儿茶酚胺(catecholamine)。

肾上腺髓质激素的生理功能主要是促进糖的分解代谢,特别是肝中糖元分解,导致血糖升高,加强了心脏和血管收缩,使心跳加速,血压上升。肾上腺素对心脏作用较大,是强心剂;去甲肾上腺素对血管的作用较大是加压剂。两者都有助于机体的应变能力。它们还有松弛支气管等平滑肌的作用。以上这些效果和交感神经兴奋引起的相似。

人们研究认为：肾上腺髓质激素主要是通过羟基及胺基的作用发挥其生理功能，儿茶酚胺的靶细胞膜上通常可能有两种儿茶酚胺受体：α-受体和β-受体。去甲肾上腺素主要作用于α-受体，引起cAMP水平下降，这与血管收缩有关。肾上腺素对α-与β-受体均有作用，对β-受体的作用与血管扩张，心率加速，糖元分解有关。

中药麻黄素(ephadrine)的化学结构为



所以在结构上以至功能上与肾上腺素有某些相似，可用于松弛支气管等以治疗哮喘。

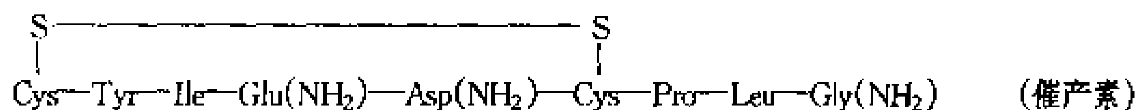
10.4.2 多肽和蛋白质类激素

多肽和蛋白质类激素都是动物的不同器官组织合成的，有的在合成后被转移到其它器官组织分泌。下丘脑分泌的激素和垂体前叶分泌的某些激素还具有调节其它激素分泌的作用。

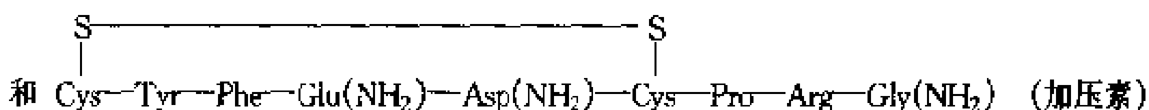
下丘脑、垂体中叶和后叶分泌的激素是较小的多肽。垂体前叶分泌的蛋白质类激素大多是糖蛋白。胰岛和甲状旁腺等分泌的属于一些较大的多肽或蛋白质。

(一)垂体后叶激素

垂体后叶激素一般可以分为催产素(oxytocin)和加压素(vasopressin)两种，它们都是在下丘脑以八种氨基酸合成的多肽，而由垂体后叶分泌。其氨基酸残基的顺序结构分别为



和



由此可见它们的结构很相似，只是第3和第8位上有两个氨基酸之差异，在生理上的功能都是经cAMP协同而呈现的。催产素的生理功能是促使子宫肌肉和乳腺肌肉等平滑肌收缩，具有催产和促进排

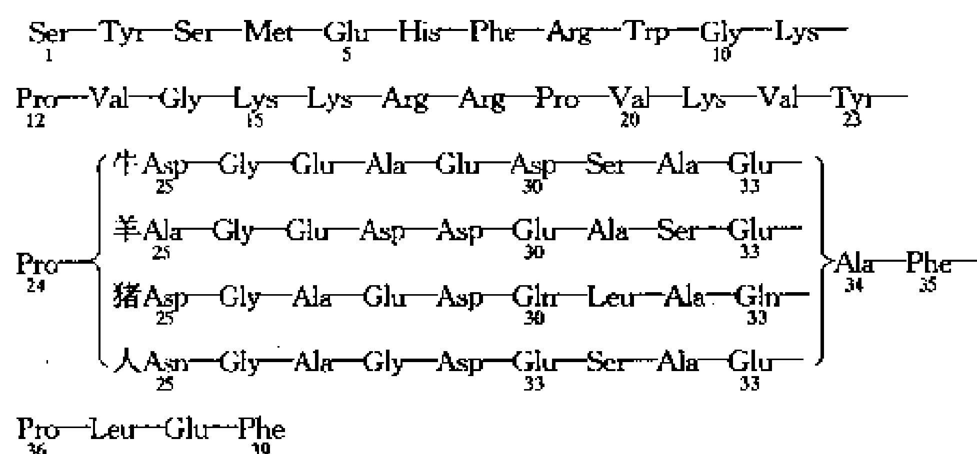
乳等作用，通常用于引产和减少产后出血等临床。

加压素的生理功能是使毛细血管收缩，升压，还能调节水代谢，抗利尿而减少排尿的作用，所以也是抗利尿激素（antidiuretic hormone，ADH），可用于治疗尿崩症和咯血。

（二）垂体中叶激素：垂体中叶分泌的激素含有α-和β-两种，属于促黑激素（melanocytestimulating hormone，MSH）。α-的是13肽。β-的随生物种类不同而异，人的是22肽。它们都有一个共同的7肽片段，即（－Met－Glu－His－Phe－Arg－Tyr－Gly－），它在不同的顺序位置上，这是呈现活性所必需的。此种激素的功能是调节细胞内色素的生成。

（三）垂体前叶激素：它包括六种激素。

（1）促肾上腺皮质激素（adrenocorticotropic hormone，ACTH）是39肽，在氨基酸残基的顺序结构上，N端前面13肽片段与α-MSH基本相同，因此，它也呈现微弱的促黑激素活性。其1～24的肽段是促肾上腺皮质激素表现活性所必需的序列，而肽段25～33序列是与种属特异性有关。其氨基酸顺序结构为：

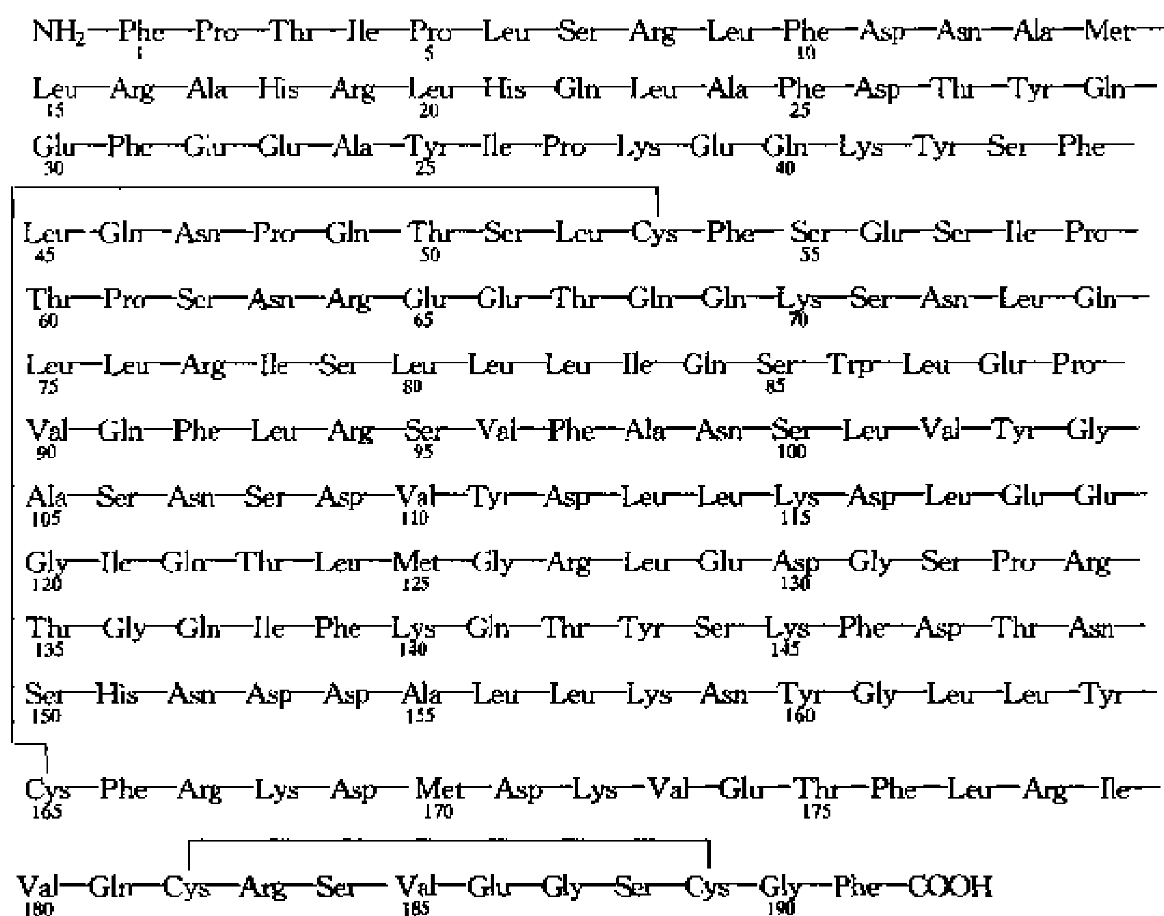


由于cAMP能作用于细胞膜，使其对葡萄糖、胆固醇等的通透性增大，激活糖代谢的有关酶，加强磷酸戊糖支路代谢，使NADPH积累，并通过蛋白激酶影响转录，推动某些酶的合成，最终促进ACTH的合成与分泌。ACTH的生理功能可以治疗痛风、哮喘等疾患。

(2)脂肪酸释放激素(lipotropin, LPH)常见的有两种：β-LPH 由 91 个氨基酸残基组成；γ-LPH 由 58 个氨基酸残基组成。它们和 ACTH、MSH 及 β-内啡呔都是从同一大分子前体皮质激素原，通过成对的碱性氨基酸间断裂而形成的，即皮质激素原先分裂为 ACTH 和 β-LPH，然后 ACTH 中产生 α-MSH 而 β-LPH 中分裂出 β-内啡肽和 γ-LPH，进一步又转变出 β-MSH。

脂肪酸释放激素的功能是促进脂肪水解。

(3)生长激素(somatotropin, STH)：它是相对分子质量约在 20000～25000 范围内的蛋白质，其化学结构随种属而有所不同。例如人的生长激素是由 191 个氨基酸组成，相对分子质量约为 21500，其一级顺序结构为：



由此可见，它是直链结构，在体内按一定规律螺旋折叠，造成 53 位和 165 位的半胱氨酸以—S—S—键相结合，同时导致 182 位和

189 位的半胱氨酸也以—S—S—键结合，但牛的生长激素是有分支的 Y 形结构。结构上的差异会在功能上呈现出种属的特异性，牛的生长激素对人是没有作用的。

生长激素的作用是能影响 RNA 聚合酶的合成，调节 RNA 的转录，抑制糖酵解，促进蛋白质合成（特别是粘多糖和胶原的合成）与钙、磷的吸收。所以它能导致刺激组织和骨骼的生长，也有一些催乳功能。生长激素分泌不足可能引起侏儒症；分泌过多可能会导致畸形巨人。

(4)催乳激素(luleotropic hormone，LTH，Prolation，PL)、促黄体生成激素(luteinizing hormone，LH)、促卵泡激素(follicle stimulating hormone，FSH)，这些统称为性腺刺激激素(gonadotropic hormone 或 gonadotropin)，它们的分泌受下丘脑激素的控制。此外，还有促甲状腺激素(thyroid-stimulating hormone，TSH)也属垂体前叶激素。

催乳激素的结构也因生物种属不同而异，生理功能是促进乳腺中 RNA、糖代谢和脂代谢有关的酶以及乳汁蛋白质的合成，并刺激乳汁分泌和维持黄体分泌孕酮。

促黄体生长激素(LH)和促卵泡激素(FSH)以及促甲状腺激素(TSH)都是垂体前叶分泌的糖蛋白，且均由两条肽链以次级键结合在一起所构成的，一条称 α-链是稍短的，一条称 β-链是稍长些。这三种激素的 α-链彼此的结构十分相似，较大差异在于 β-链，大概此差异决定了它们的特定生理活性。通过分子杂交实验的研究也发现：LH-β-链与 TSH-α-链杂交所形成的激素，表现出 LH 的活性；TSH-β-链与 LH-α-链杂交，表现为 TSH 的活性；FSH-β-链与 LH-α-链杂交所合成的激素，表现出 FSH 的活性等，说明三者各自的 β-链是分别决定它们生理活性的主要结构因素。

LH 的生理功能是它作用于靶细胞的受体后，能将 cAMP 水平提高，促进胆固醇合成及性激素的转化。对雌性动物的作用，它能和 FSH 协同促使卵巢黄体的生长与成熟，促进孕烯醇酮的分泌。对雄性动物的作用是促使睾丸的间质细胞分泌雄性激素；由于它的靶细

胞是间质细胞，故又称为促间质细胞素(interstitial cell stimulating hormone，ICSH)。

FSH 的生理功能是控制性细胞(精子和卵子)的发育与成熟，并具有促使卵巢分泌雌激素的作用。

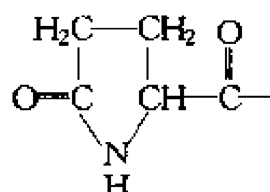
TSH 的生理功能是对甲状腺上皮细胞质膜受体作用，促使 cAMP 增加，活化甲状腺激素合成有关酶，致使甲状腺生长和甲状腺激素分泌。

(四)下丘脑激素(hypothamic hormone)

下丘脑是中枢神经的一部分，能合成和分泌多种控制垂体前叶激素释放的下丘脑激素，其中有的能促进垂体前叶激素的释放，如促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone，CRH)，促甲状腺素释放激素(Thyrotropin releasing hormone，TRH)，促黄体生成激素释放激素(Lutenizing hormone releasing hormone，LRH)，促卵泡成熟激素释放激素(Follicle stimulating hormone releasing hormone，FRH)等；也有的起着抑制垂体前叶激素释放的作用，如生长激素释放抑制激素(Growth hormone releasing hormone，GRIF)，促黑激素释放抑制激素(Melanocyte releasing hormone，MRIF)等。当外界条件发生变化，刺激传至下丘脑，它就会将下丘脑激素通过垂体门静脉运送至垂体前叶，调节相应的垂体前叶激素释放，以适应外界环境和机理的需要。所以，下丘脑激素通常具有调控脑下垂体激素的功能。

根据已研究确定了化学结构与可人工合成的 4 种，介绍如下：

(1)促甲状腺素释放激素(TRH)，其顺序结构为三肽顺序：Pyro—Glu—His—Pro—NH_2，其 Pyro—Glu—为焦谷氨酸残基，即



在 N—端。

焦谷氨酸是环状内酰胺结构，为这种激素生理活性所必需的，有利于防止氨肽酶的破坏。C—末端为脯氨酰胺，可能起着防止羧肽酶降解的作用。

TRH没有种属特异性，具有使垂体前叶释放促甲状腺素的功能，有一定的催乳作用，而临床上却用它诊断和治疗甲状腺机能减退症。

(2)促黄体生成激素释放激素(LRH)，它是十肽分子，Pyro—Glu—His—Trp—Tyr—Gly—Leu—Arg—Pro—Gly—NH_2，其N—端也是分子活性所必需具有的焦谷氨酸，而C—末端是甘氨酰胺。

LRH的生理功能是控制垂体的黄体生成激素(LH)和促卵泡成熟激素(FSH)的分泌，并通过它们调节性腺的功能。现用它进行妇科诊断，以及治疗下丘脑-垂体系统机能衰退引起的不育症。LRH也用于家鱼的催产。

(3)促黑激素释放抑制激素：它是三肽和五肽的，化学结构分别为

Pro—Leu—Gly—NH_2 和 Pro—His—Phe—Arg—Gly—NH_2

二者的特点均是以脯氨酸残基为N—端，而以甘氨酰胺为C—末端，这大概是它们具有相同功能的原因所在。

(4)生长激素释放抑制激素：它是14肽分子，即Ala—Gly—

```
S————————————————————————————————————————S
|                                        |
Cys—Lys—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys—Thr—Phe—Thr—Ser—Cys,
```

由于它具有一对—S—S—键，分子的空间形态必然是弯曲折叠的。它可用于控制血糖和治疗肢端肥大症。在进行克隆技术研究中已成功地将人工合成的基因放入大肠杆菌中而实现了表达。

综上所述，下丘脑激素的量处于微微克(pg)水平，却发挥了很显著的调节作用。下丘脑激素和垂体前叶分泌的某些激素能控制其它激素的合成和分泌，反之，被控制的这些激素又能反馈地作用于下丘脑和垂体，调节下丘脑激素和垂体前叶激素的合成和分泌。例如肾上腺皮质激素分泌过多时，可反馈地抑制下丘脑CRH与垂体前叶

ACTH 的分泌,使它们均调控在一定适宜的水平上。这是生命有机体协调统一的证例。只要其中一个环节出现障碍便会引起生物新陈代谢的失衡。

(五)胰岛激素

它包括胰高血糖素和胰岛素,是分别由胰岛中 α-、β-和 δ-三种细胞中 α-细胞与 β-细胞进行合成和分泌的。

(1)胰高血糖素(glucagon):这是相对分子质量为 3485 由 29 个氨基酸组成的多肽分子,即

His—Ser—Glu(NH_2)—Gly—Thr—Phe—Thr—Ser—Asp—Tyr—Ser—Lys—Tyr—Leu—Asp—Ser—Arg—Arg—Ala—Glu(NH_2)—Asp—Phe—Val—Glu(NH_2)—Try—Leu—Met—Asp(NH_2)—Thr

胰岛 α-细胞最初合成的是一个在 C—末端比它多 8 个氨基酸残基的前体,分泌时才转化为有活性的胰高血糖素。

胰高血糖素分泌后经门静脉运至肝脏才发挥促进糖酵解和糖异生的作用,最终导致增血糖效应,这种效应是通过 cAMP 完成的,这点有类似肾上腺素之处。不过,胰高血糖素主要作用于肝脏,由于肝脏中腺苷酸环化酶受体对胰高血糖素非常敏感,因此,在促进肝糖原酵解方面的作用比其它激素更强,它促进肝糖原降解的过程快而持续时间短,而肾上腺素主要促进肌糖原分解。

胰高血糖素还能通过 cMAP 活化肝脂肪酶而导致脂肪酸的形成,促进骨骼肌中蛋白质分解,从而增进糖的异生,不过,它促进脂肪分解的作用只有肾上腺素的 1/7,并且对促进糖异生的作用是慢而持续时间较长的过程。

根据合成肽的比较实验所得结果表明:N—末端的 His—和 24~27 位氨基酸残基对促进肝糖原酵解作用是必需具备的;N—末端的 His 和 19~21 位氨基酸残基是分子具有促进脂肪分解活性所必需的;22~27 位氨基酸序列对于和靶细胞上受体(肝细胞膜上的受体可能是一种脂蛋白)的结合起着重要的作用。

(2)胰岛素(insulin):它是胰岛β-细胞分泌的,相对分子质量为6000蛋白质,由含21个氨基酸的A链和含30个氨基酸的B链组成的,两链间通过S—S键联结。

```
Glu—Val—Leu—Gly
|              1
5Gln—NH2                                                           NH2
|                                                                   |
Cys—S———————S               NH2          NH2        Asn
|           |                |            |          |
Cys—Ala—Ser—Val—Cys—Ser—Leu—Tyr—Gln—Leu—Glu—Asn—Tyr—Cys 20
|            10                   15                  |
S                                                     |
|                                                     |
S                                                 S———S
|                                                 |
Cys—Gly—Ser—His—Leu—Val—Glu—Ala—Leu—Tyr—Leu—Val—Cys—Gly 20
|            10                  15                   |
Leu  NH2  NH2                                        Glu
|     |    |                                          |
5His—Gln—Asn—Val—Phe  Ala—Lys—Pro—Thr—Tyr—Phe—Phe—Gly—Arg
                  1    30                  25
```

从不同生物中提取的胰岛素,其氨基酸组成和抗原性质往往有或多或少的差别,而在激素的生物活性方面似乎没有呈现出种属的特异性。

胰岛素最初是以一条单链分子的前体形式合成的,称胰岛素原(Proinsulin),它在分泌后加工成熟激活过程中,会切去胰岛素原中连接B链和A链的中间一段30几个氨基酸组成的C肽,即

B链┼Arg—Arg—Glu—Ala—Gln—Arg—Pro—Glu—Ala—Gly—Ala—Val—Glu—Leu—
Gly—Gly—Gly—Leu—Gly—Gly—Leu—Gln—Ala—Leu—Ala—Leu—Glu—Gly—
Pro—Pro—Gln—Lys—Arg┼A链

才形成有活性的胰岛素。分泌后通过门静脉进入肝脏,然后由体循环运至其它组织,不过,在代谢中受胰岛素调节的主要组织是肌肉、脂肪和肝脏,而红细胞、肾脏和脑组织相对地几乎不受胰岛素的影响。胰岛素到达靶细胞后,或者通过环状核苷酸的第二信使作用,或者直接影响基因表达以完成其最终调节效应。

胰岛素对代谢具有十分广泛的调节作用,最主要的是促进细胞膜对葡萄糖、氨基酸、K^+等的通透性,促进糖原合成酶的合成与活性,抑制肝糖原的分解,因此具有降低血糖的作用。它还有促进氨基

酸转移和蛋白质合成，以及抑制脂肪分解与促进脂肪酸合成的作用。胰岛素的功能应用主要是治疗糖尿病，为了满足医药上的需要，近来还发展了以固定化酶改造猪胰岛素为人胰岛素的方法。

胰岛素与肾上腺素或胰高血糖素导致 cAMP 浓度升高效应的相反，它是抑制腺苷酸环化酶但却能激活鸟苷酸环化酶，促进 cGMP 的合成，从而进一步引发其它效应。

1965 年在我国第一次成功地实现了人类所期待的在实验室用化学方法合成生命物质胰岛素。其基因也已在原核生物进行了克隆表达。

（六）甲状腺和甲状旁腺激素

甲状腺除了分泌氨基酸衍生物类型的甲状腺素外，它还可以合成和分泌一种多肽激素，即降钙素（calcitonin）。甲状旁腺也会合成和分泌一种称作甲状旁腺激素（Parathyroid hormone）的单链多肽。

（1）降钙素是由 32 个氨基酸组成，相对分子质量为 3600。其一级顺序结构为

S(1)—S(7)

Cys—Ser—Asn—Leu—Ser(5)—Thr—Cys—Val—Leu—Ser(10)—Thr—Tyr—Thr—Gln—Asp(15)—

Phe—Asn—Lys—Phe—His(20)—Thr—Phe—Pro—Gln—Thr(25)—Ala—Ile—Gly—Val—Gly(30)

Ala—Pro—NH_2

它的生理作用正好和甲状旁腺激素抗衡，能抑制骨钙的溶解，降低血钙；还会对肾起作用，增加尿磷的排出，降低血磷。

（2）甲状旁腺激素是由甲状旁腺分泌的 84 个氨基酸残基组成的单链多肽，相对分子质量为 9500，其 N—端起 1～34 的肽段顺序和激素活性相关，这片段顺序表达如下：

H_2N—Ser(1)—Val—Ser—Glu—Ile(5)—Gln—Leu—Met—His—Asn(10)—Leu—Gly—Lys—His—Leu(15)—

Asn—Ser—Met—Glu—Arg(20)—Val—Gln—Trp—Leu—Arg(25)—Lys—Lys—Lys—Gln—Leu(30)—

Val—His—Asn—Phe(34)……

甲状旁腺激素的生理功能是升高血钙，与降钙素共同调节钙、磷代谢，维持血钙、血磷浓度相对稳定。甲状旁腺机能亢进时，常导致

骨质疏松之类的患害;若甲状旁腺机能衰退时,由于血钙下降,可能出现肌肉痉挛、抽搐等症状。

(七)胎盘激素

胎盘分泌的蛋白质激素最主要的是:胚盘绒毛膜促性腺激素(chorionic gonadotropin,CG)、胎盘催乳素和松弛素(relaxin)等 3 种。其它还有如绒毛膜促甲状腺激素等其生理功能尚未明确。

(1)胚盘绒毛膜促性腺激素是一种相对分子质量约为 47000,由 α-与 β-两种亚基组成的二聚体糖蛋白;α-亚基相似于 LH 的,所以有相同的免疫性。

(2)胎盘催乳素是由 190 个氨基酸组成的,其相对分子质量为 21600,生理功能尚不清楚。

(3)松弛素是卵巢黄体合成和分泌的多肽,具有使骨盆韧带松弛、子宫颈变软的功能,现用于治疗痛经和滞产等。人们也将它归于胎盘激素。

(八)其它的多肽蛋白质激素

例如,胸腺素(thymosin)是与免疫力有关的幼年动物胸腺分泌的蛋白激素;

肠胃道激素,它们和消化液的分泌及胃肠的收缩蠕动有关;

从 ACTH 家系分离出来的内啡肽和脑啡肽,它们可用于镇痛等;

此外,血管紧张肽,又称增血压素,可用于抢救中毒性休克、失血性休克等病人。

还有用于降血压等的血管舒缓激素等。

10.4.3 甾醇类激素

甾醇类激素种类很多,它们分别由肾上腺皮质、性腺和胎盘组织合成和分泌的,各自为在环戊烷多氢菲核上连有不同侧链基团的胆甾醇衍生物。根据已知甾体激素因侧链基团不同所造成分子包含碳原子数有 21、19 和 18 三种,则分为三种类型(C-21、C-19、C-18)。但它们有共同的前体,合成产物过程中因不同组织的酶系差别而发生

分化，导致最后生成不同的激素。

通常，甾体激素按其生理功能大体分为肾上腺皮质激素和性激素。肾上腺皮质激素又可进一步分为糖皮质激素(glucocorticoid)和盐皮质激素(mineralocorticoid)；性激素再分为雄性激素(androgen)和雌性激素(estrogen)。它们在生理作用的活性方面都有不同程度重叠交叉。

甾醇类激素的作用方式是先和存在于细胞质中的受体形成复合体进入细胞核，然后结合于染色质的特异部位，促进特定的 RNA 和蛋白质的合成，并通过它们表达生理功能。

此外，昆虫中也能分泌甾醇类激素例如蜕皮激素。

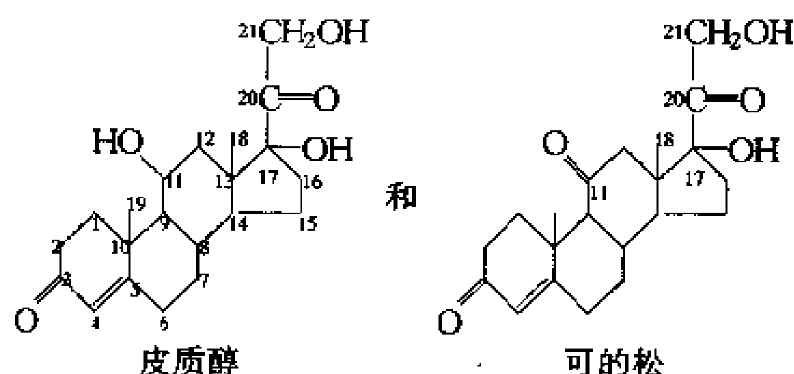
(一)肾上腺皮质激素

肾上腺皮质内所分泌的多种甾体物质中，表现出肾上腺皮质激素功能的有数种，它们是皮质醇、可的松、皮质酮、11-脱氧皮质酮和醛固酮等 C-21 类型甾醇类物质。其中皮质醇的糖皮质激素和醛固酮的盐皮质激素在生理功能上的活性最强。

(1)糖皮质激素的作用是促进脂肪组织中脂肪的分解，肝中蛋白质的分解，降低葡萄糖的吸收和分解，增强糖的异生，致使血糖升高，有抑抗胰岛素的作用，有可能使糖尿病患者进一步恶化；它还具有降低防御反应的机能，因而有抗炎症，抑制免疫反应的作用。此外，它能促进胃酸和胃蛋白酶的分泌，因而对消化性溃疡患者不利。

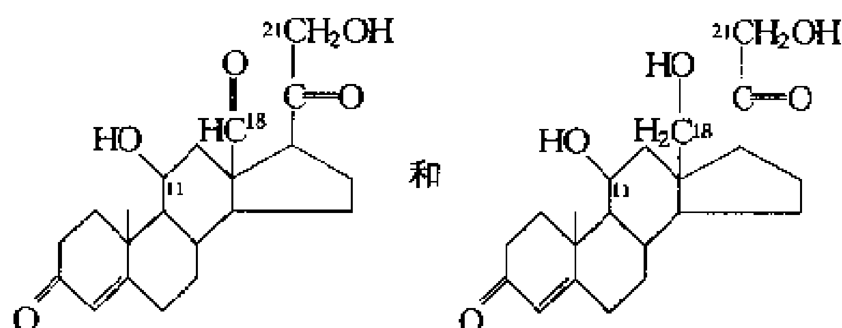
(2)盐皮质激素的作用是增强 Na^+、Cl^- 的再吸收，减少它们从汗腺、消化管系、唾液腺中的排泄，同时促进细胞外液中 Na^+ 和细胞内 K^+ 的交换与 K^+ 的排泄。

甾醇类激素的 21 位碳原子上羟基化是糖、盐皮质激素所必需的，同时 11 位碳上羟化或酮基化与 17 位碳上羟化对增强糖皮质激素是有益的，例如皮质醇与可的松的化学结构分别为：



皮质醇　　可的松

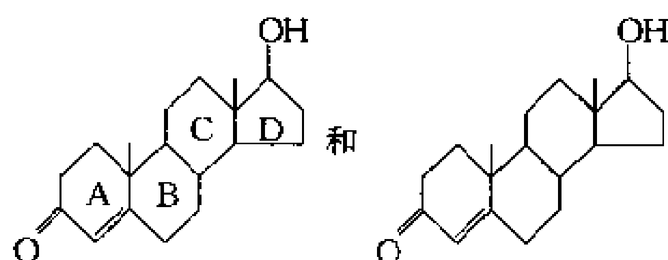
对于增强盐皮质激素的活性，第18位碳上羟化是重要的，例如醛固酮和18-羟皮质酮，它们的化学结构分别为



（二）性腺激素

睾丸和卵巢能分别合成甾体性激素-雄性激素和雌性激素。它们的作用是通过促进蛋白质的合成，调节性器官的发育。然而这些激素的合成与分泌是受脑下垂体促性腺激素的控制。经研究发现，肾上腺皮质也能合成和分泌性激素，但对生殖机能的影响很少。这是因为雄的肾上腺皮质合成的雄性激素活性很低，而雌的肾上腺皮质合成的雌性激素极少。

（1）雄性激素都是含C-21的甾体类，具有雄性激素活性的有多种，主要的有睾酮（Testosterone）、雄烯二酮（androstenedione）、雄酮（androsterone）和去氢表雄酮（dehydroepiandrosterone，DHEA），其中睾酮活性最强，在前列腺等某些细胞中二氢睾酮活性更大。它们的化学结构分别是

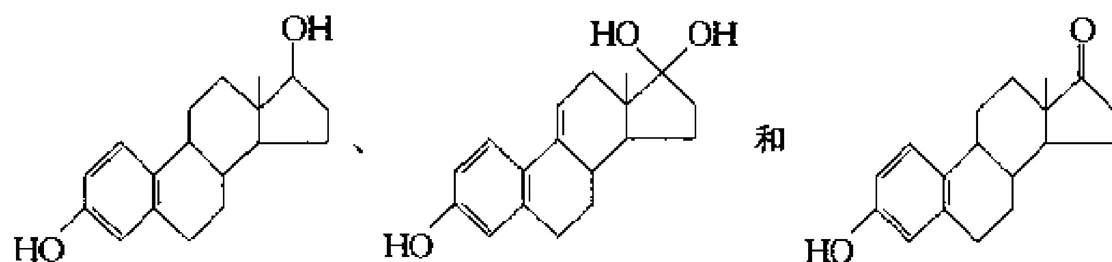


雄性激素绝大部分由睾丸间质细胞合成，肾上腺皮质合成睾酮 5%左右，但睾丸组织缺乏 11-、21-羟化酶而不能合成皮质激素。卵巢也能分泌少量睾酮。

雄性激素的生理功能是促进男性副性器官的发育成熟。它还能增强 RNA 聚合酶和核糖体氨酰转移酶的活性，促进蛋白质合成和糖酵解，而且睾酮在促进蛋白质合成方面比其它天然甾体激素强。

(2)雌性激素有二类：雌激素(estrogenic hormone)和孕激素(progestational hormone)。

(A)雌激素在通常情况下主要由卵巢合成分泌，在卵子成熟而排卵前，发育的卵泡合成分泌雌激素，所以也称卵泡激素(follicular hormone)。它是 C-18 甾体物质，其特点是 A 环为酚，引起带酸性。体内主要的雌激素有三种，它们是雌二醇(estradiol)、雌三醇(estriol)和雌酮(esterone)，其化学结构依次为



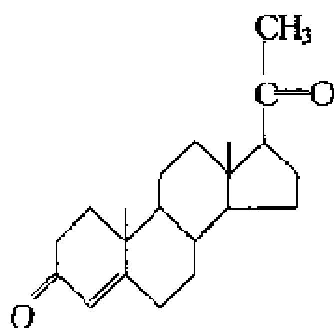
其中雌二醇活性最高。

雌激素的作用是促进雌性副性器官的发育和副性征的出现，这种生理功能也是雌激素通过和细胞质中的受体结合后进入细胞核，进而影响染色质，调节蛋白质合成，才呈现的。

通过研究，已经人工合成了非甾类物质己雌酚(hexestrol)和己

烯雌酚等一类物质。它们有雌激素相似的生理功能，对比结构，推测可能是这两种物质都含有酚基团的原因，现已用于治疗妇科病症，还可用于“阉鸡”，使鸡肉嫩又鲜美。

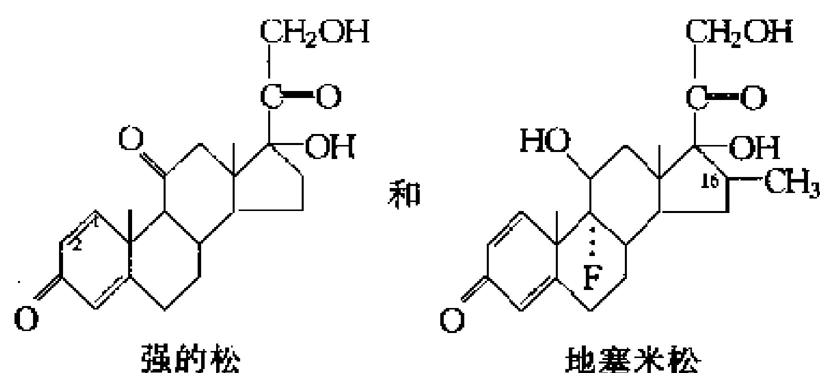
(B)孕激素是 C-21 甾体物质，是合成其它甾体激素的中间产物，活性的孕激素是孕酮(Progesterone)，其化学结构为



它是由黄体分泌的，所以又称黄体激素(luteal hormone)，即在脑下垂体前叶的促卵泡激素作用下，卵泡发育成熟，排出卵子，本身发育成黄体，然后由黄体分泌孕激素。

孕激素的生理作用是协同雌激素，促进子宫发育，内膜增生，保证受精卵着床、安胎，促进乳腺发育，维持妊娠，并阻止排卵，抑制动情和月经，减少子宫收缩。在妊娠期间，胎盘成为分泌雌性激素的主要组织，肾上腺皮质及睾丸虽也能合成雌激素和孕激素，但其量极微。

甾醇类激素，特别是肾上腺皮质激素中的糖皮质激素能减轻炎症，消除过敏反应等在医学上已广泛地应用。为了提高此类激素的治疗效果，减少副作用，人们在不断研究，对激素结构上进行改进，并合成了不少可的松衍生物，它们的抗炎和抗过敏作用比可的松好。例如：泼尼松即强的松，在第 1，2 位碳原子间，使之具有双键；地塞米松在第 9 位碳上连接了氟而第 16 位碳上连接了甲基，它的抗炎和抗过敏作用更增强了。它们的化学结构分别是



它们是以化学法、微生物酶法(固定化酶法)等综合工艺制得的。

人们还根据甾醇激素的结构,研究了口服避孕药,目前制取和使用的主要是针对女性的,大多为雌激素或孕激素的衍生物或类似物。其中有避孕率达 99%的乙炔雌二醇、炔诺酮等,还合成了炔雌醚。它们的作用机理是通过反馈地抑制垂体促性腺激素的分泌。炔雌醚还能缓慢地释放和代谢成乙炔雌二醇而呈现长效之效果。

综上所述,雄性激素和雌性激素虽在生理功能上有相反的作用,但在合成上有共同的初过程,在以后的代谢过程中才分别通过歧化反应等转化为相应的性激素,所以根据化学反应动力学规律,睾丸和卵巢都有可能按一定比例,但各自在很大程度上倾向一方地合成上述两类结构相近的雄、雌性激素,而且这两类性激素在睾丸和卵巢中的合成比例还有可能相互转变。

(三)蜕皮激素(molting hormone 或 ecdysone)

昆虫激素大体上可分成两类:昆虫内激素和性外激素。昆虫内激素由体内腺体分泌,可调节、控制昆虫的生长发育,它包括脑激素、保幼激素和蜕皮激素,只有蜕皮激素属于甾体激素。保幼激素是类萜物质。脑激素是多肽蛋白类物质,由脑神经分泌细胞分泌,它能调节蜕皮激素和保幼激素的分泌。昆虫性外激素也不属于甾醇类物质。

蜕皮激素由前胸腺分泌,是 C-27 甾醇类物质。根据第 20 位碳原子上有无羟化而分为 β-和 α-两种。它的生理功能是控制昆虫(包括甲壳类)变态,促进幼虫化蛹以至变为成虫,当保幼激素协同作用

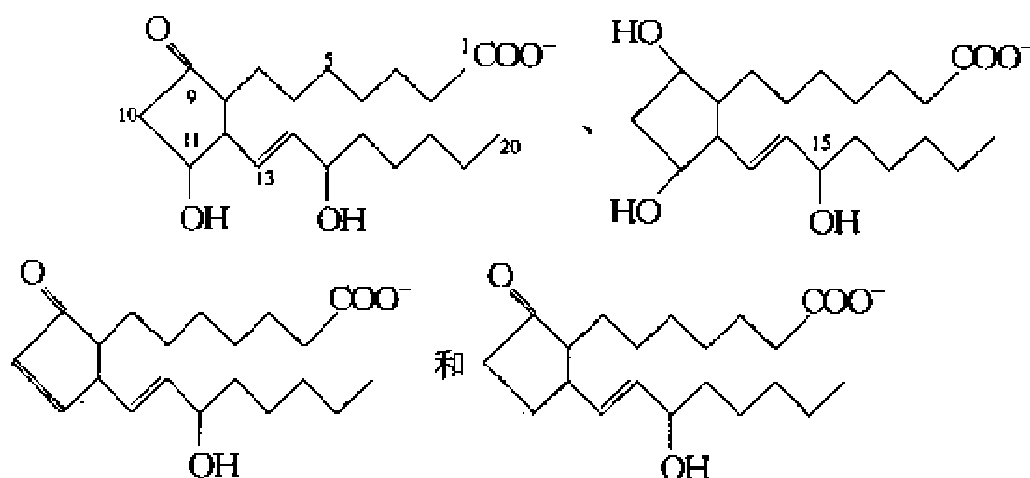
时能促进蜕皮。

10.4.4 脂肪族激素

前列腺素(prostglandin,PG)、保幼激素(juvenile hormone)昆虫外激素和某些植物激素等都属于脂肪族激素。

(一)前列腺素

前列腺素是含五元环的二十碳脂肪酸,为脂肪族激素中主要的一类。根据五元环主结构和取代基,归纳成 E、F、A 和 B 四类,又按五元环外侧链中双键数目,以下标注明每一类的分类,譬如 PGA_1、PGA_2、PGA_3 等。若以五元环外侧链中含一个双键为例,PGE_1、PGF_1、PGA_1 和 PGB_1 四类的化学结构分别为



它们一般被认为是起局部作用而不影响全身的激素。同一类前列腺素在不同组织细胞中往往发挥不同的作用,在人的脂肪中分离得到的成纤维细胞受到 PGE_1 影响后,会使 cAMP 的含量增加 95 倍,而在血小板中似乎没有在这方面呈现出功能。不同类的前列腺素对同一种组织的作用也往往不同,PGE 类可使静脉平滑肌放松而 PGF 会使之收缩。PGE 与许多细胞的专一性结合会使腺苷酸环化酶的活化和 cAMP 的积累,而 PGF 却无此作用。现已发现,在几种组织和细胞中 FGF_2 会使 cAMP 的含量增加。但是对于这些化合物的作用机制尚不清楚,还有待于进一步研究,无法在此详尽地描述。

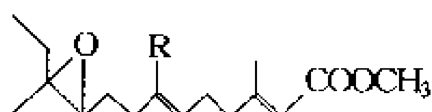
前列腺素的生理功能只能大体上概括如下:能调节血管的收缩

和扩张，以及血压的升高和降低，调节子宫、平滑肌等扩展和收缩，增加血管壁与质膜的透性，影响通过突触(神经细胞和靶细胞间的特殊连接的简称)的传递，抑制脂质分解等。此外，PGE 和 PGF 还有抑制炎症的效应。所以医药上将前列腺素用于治疗高血压；临床引产；提高怀孕率；支气管解痉，缓解哮喘，抑制胃酸分泌，控制胃溃疡等。

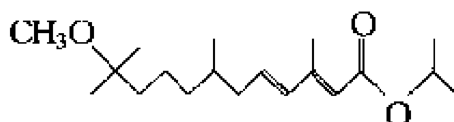
(二)保幼激素

保幼激素的生理功能是维持昆虫处于幼虫阶段，防止早熟而分化变态为成虫，所以昆虫在其生长发育阶段可能都需要保幼激素。用保幼激素处理成虫，能导致不孕而灭种。通过研究发现，保幼激素与蜕皮激素一样也存在于某些组织体内。还从某些植物中发现“抗保幼激素”，它们能使昆虫早熟、变态，这可能是另一种有效杀虫剂。

保幼激素主要是昆虫分泌的一种昆虫内激素，有Ⅰ、Ⅱ两种，其结构为



若 $R=C_2H_5$ 则为Ⅰ型；$R=CH_3$ 为Ⅱ型。它的衍生物或类似物已开始用于害虫防治，人们用人工合成的有效激素杀虫剂——二烯异丙酯，其结构为

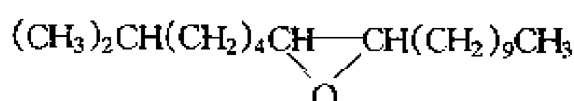


便能阻止蚊虫等正常变态，致使其死亡。不过，若以适当计量处理家蚕幼虫，可使幼虫龄期延长，吐丝量提高，有利于增产。

(三)昆虫外激素

昆虫外激素系指昆虫分泌到体外发挥作用的激素，主要包括昆虫“性外激素”和“蜂王物质”。

(1)昆虫性外激素(sexpheromone)属长链烷烃衍生物类，从不同昆虫分泌的性外激素，其结构也显著不同，因而各有其特异性。例如，舞毒蛾和棉红铃虫的性外激素之化学结构分别是



和 

这类物质实际上是性引诱剂，它被分泌后散发到空气中，能刺激引诱异性昆虫，于是人们利用其作为害虫的捕诱剂。

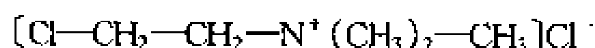
(2)蜂王物质是蜂王分泌到体外的物质。经接触粘染的幼蜂，被抑制了卵巢发育而变为工蜂。这种蜂王物质的化学本质尚未弄清楚。

(四)某些脂肪族植物激素

植物激素也有些是脂肪族衍生物，例如：

乙烯，其生理作用是降低生长速度，促进果实成熟。现已人工合成生产了 2-氯乙基磷酸($ClCH_2CH_2PO(OH)_2$，通称乙烯利)，它被植物吸收后便释放出乙烯，于是可用在水果(例如香蕉)等果实的催熟，还能提高橡胶产量。

还有矮壮素，它是氯代氯胆碱，即



$$[Cl—CH_2—CH_2—N^+(CH_3)_2—CH_3]Cl^-$$

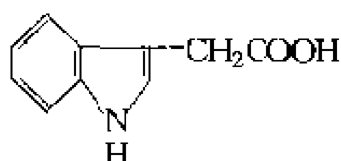
简称 CCC，具有促进细胞分裂等作用，在生产上用于防止小麦倒伏，提高产量。它尚有抗赤霉素的性能。

10.4.5 苯环及杂环类激素

植物激素大多数是苯环或杂环衍生物。

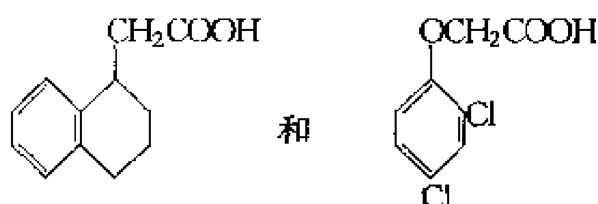
(一)生长素

从植物体内提出的生长素是吲哚乙酸，其化学结构为：



它的作用是促使细胞萌长、生根和结无籽果实等。用它处理种子和块茎，有催促萌发的效果，以它处理后的扦插植物的存活率会提高。

在实际应用上是以人工合成的生长素代替，如萘乙酸或 2,4-二氯苯氧乙酸（简称 2,4-D），它们分别用于防止棉花、果树等落铃落花果或促使蕃茄等提早结果，同时也有除草剂效用。它们的结构分别表述如下：



分子中的苯环类和乙酸基结构对它们上述的功能是起着极其重要的作用，但分子含有的二氯苯环基团可能会导致间二氯苯残留时间过长。

（二）赤霉素（gibberellin，GA）

在自然界发现的赤霉素约有 40 种，它们是含赤霉烷核的一类物质，其中 GA_3 的活性最强，在体内以葡萄糖苷形式存在。它能诱导淀粉酶、蛋白酶等的合成，还能提高核酸合成酶的活性，促进种子萌芽和茎叶生长，加速发育，防止花果脱落等。

现在所生产的赤霉素是应用发酵技术获得的。

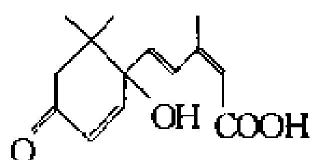
（三）细胞分裂素（cytokinin）

细胞分裂素是一类嘌呤衍生物，例如 6-呋喃甲氨基嘌呤是从酵母中发现，称激动素（kinetin）；6-氨基嘌呤是从受精玉米种子中分离到的，称玉米素（Zeitin）。

细胞分裂素的生理功能是促进核酸与蛋白质合成、物质转运，促进细胞分裂和分化，延迟和防止器官衰老，这些作用可能与它含有嘌呤的结构有关。人工合成的 6-苄基腺嘌呤在生产实践应用中，表明除了能提高谷物产量外，还能延长蔬菜、蕃茄和鲜花的贮藏时间。如果细胞分裂素与生长素合用还能有效地进行单倍体育种。

（四）脱落酸（abscisic acid）

脱落酸是在衰老与休眠的木本植物与脱落的棉铃中提取到的物质，其结构如下：



它的功能活性可能与分子含有六元环上羟基和同位碳上侧链羧酸有密切关系。

脱落酸能抑制生长，促进植物离层细胞成熟，引起植物休眠和落叶，还可能增加苹果树幼苗的御寒能力。

上述激素的大多数是由腺体分泌后，直接作用靶细胞而表现出各种生理功能；垂体前叶分泌的某些激素是作用于内分泌腺体，调节和促进其中相应激素的合成和分泌，故有"促激素"之称；下丘脑是植物性神经系统的高级中枢，也是内分泌器官，下丘脑细胞具有神经细胞与分泌细胞双重特性，它能合成和分泌名为激素释放因子的激素或名为释放抑制因子的激素（统称神经激素），起着更高一级"层次"的调节作用，调节着垂体前叶和中叶内"促激素"的合成和分泌；大脑皮层又控制着下丘脑激素的分泌，大脑皮层分泌的儿茶酚胺作用于下丘脑，促进了相应的各种激素释放因子的释放，而大脑皮层分泌的5-羟色胺会抑制相应的各种激素释放因子的释放，也能促进另一些相应的激素释放因子的释放。激素的合成和分泌除了由"高层次"到"低层次"（即大脑皮层→下丘脑→脑下垂体→各组织内分泌腺）的调控外，还受到不同水平的由"低层次"到"高层次"的反馈调控。例如，甲状膀腺素的作用可引起血钙升高，倘若血钙高了又能反馈抑制该激素的分泌；促肾上腺皮质激素会促进肾上腺皮质激素的分泌，然而，当皮质醇分泌过多时，又将反馈地导致促肾上腺皮质激素与其释放因子的分泌受到抑制。而且血液中 ACTH 含量足够高时，也会抑制促肾上腺皮质激素释放因子的分泌。所以，各种激素在体内是调控代谢的统一系统，致使各种生理效应适应生命活动的需要和应付外界条件的变化。任何一种激素出现异常，将会引起相应的内分泌失调的症状。

10.5 激素的作用机制

激素所表现的作用是通过影响酶的催化活性;促使细胞膜通透性的改变;调节某些酶和蛋白质的合成。这三种功能表明了它不同于酶的催化功能,也不同于维生素那样作辅酶所发挥的作用。激素要作为“第一信使”务必与相应的受体结合,然后转变为细胞内信号,以调节酶活性、膜通透性或酶与蛋白质的合成,进而广泛地调节各种生理生化过程。

激素与受体的结合表现出相当高的专一性,由于每一种激素只能与特定受体结合,所以也仅作用于各自的靶细胞,当一种激素作用于不同靶细胞时,往往所产生的效应也不同,而且靶细胞作出的相应应答的快慢也很不相同。根据激素的专一性受体所处位置和细胞内信号产生的情况,激素的作用机制大致可归纳成两种类型:第一种类型是激素和质膜上的受体结合,使受体蛋白的构象改变,进而影响质膜上的酶活性或离子通道,导致细胞内形成信号分子,人称“第二信使”,它能调节靶细胞所有有关的生理过程;第二种类型是激素和细胞内受体结合,形成激素—受体络合物,进而又和染色质结合,影响特定基因的转录表达,以调节靶细胞所有有关的生理过程。

10.5.1 激素和质膜上受体结合进行的调节

(一)质膜上受体蛋白的作用和“第二信使”产生

经研究认为,采用这种机制类型的激素都是亲水基团外向的亲水分子,它们的这种构象是无法游离状地穿过质膜疏水区而进入细胞的,于是就依赖于一些不溶性的质膜嵌合蛋白质作为它们专一对应的受体。虽然这些受体蛋白质仅占总质膜蛋白质量的1%以下,能够专一地选择和有关对应的信号分子激素结合的数目可以在500~100000/细胞范围间变动,但激素和受体之间是通过亲和力很高的次级键结合,亲合常数$K \geq 10^8 mol/L$,因此即使激素浓度极低,也能引起相应的生理效应。

激素分子和受体在细胞外侧结合后，受体蛋白会发生构象的改变，并进一步引起细胞内作为“第二信使”的信号分子的产生。较普遍的情况是通过激活名为腺苷酸环化酶的质膜结合酶，从而催化“第二信使”环状 AMP(cAMP)的形成；不过，也有可能被细胞外信号分子活化的是蛋白激酶，它进而能使细胞蛋白(例如受体蛋白、其它质膜蛋白或细胞质蛋白等)磷酸化。一个明显的例子是表皮细胞生长因子(epidermal growth facter，EGF)的受体蛋白，它可能是与蛋白激酶结合极其紧密的蛋白质，也可能本身就是蛋白激酶，当与 EGF 结合而被活化时，能进一步催化表皮细胞或其它受 EGF 调节的靶细胞中特定细胞蛋白的 Tyr 残基磷酸化，从而激发这些细胞分裂和生长。

另一种情况是受体蛋白和信号分子结合后，由于构象的改变，打开(或关闭)了质膜的离子通道，打开的离子通道引起瞬时离子流以改变跨膜电位，或者导致较大的流向细胞质的离子流，这些都能促使打开 Ca^{2+} 的通道，Ca^{2+} 就扮演“第二信使”进入细胞质。

上述提及的第二信使 cAMP 是普遍存在于生物体内，一般在动物细胞内含量约为 10^{-6}mol/L。在激素作用下，其浓度在数秒内发生 5 倍左右的变化。体外实验表明，用肾上腺素处理游离的肝细胞膜，在 ATP 存在下可诱导 cAMP 的形成，而 cAMP 可以作为信使分子替代肾上腺素活化肝细胞的无细胞膜抽提液中磷酸化酶。还有其它类似实验也表明激素可以通过形成的 cAMP 作为“第二信使”发挥生理作用。

以 cAMP 为细胞内“第二信使”的激素与在细胞膜上受体结合后，一般都是通过活化腺苷酸环化酶来调节细胞内 cAMP 的浓度水平。磷酸二酯酶的活性是在信号刺激后能催化 cAMP 迅速地解除 3′-磷酸酯键而消环形成 5′-AMP，以便继续接受新信号的诱导。

(二)G-蛋白的协同效应

人们通过研究发现，受体活化腺苷酸环化酶时尚需一种能和 GTP 结合的蛋白质，它被称为 G-蛋白，是具有 GTP 酶活性的。当它和 GTP 结合时即能协同激素受体活化腺苷酸环化酶。在 GTP 水解

为GDP后，会可逆地失去这种协同活化的作用。各种实验迹象表明，激素受体接受信号后，不是直接地而是通过与GTP结合的G-蛋白活化腺苷酸环化酶。

根据上述，可将激素调节腺苷酸环化酶活性的机制概括如下：

(1)激素分子和嵌合于细胞膜外表面的受体蛋白结合，改变受体蛋白的构象；

(2)改变了构象的受体和G-蛋白作用，并活化G-蛋白；

(3)活化的G-蛋白在细胞质侧和GTP结合后，促使G-蛋白构象改变，同时受体脱离；

(4)随后G-蛋白和嵌合于膜内表面的腺苷酸环化酶结合，并促使环化酶活化，接着便催化ATP生成cAMP；

(5)水解GTP，G-蛋白和腺苷酸环化酶恢复为原来的非活化状态。

此外，还有较复杂的情况，在某些细胞中腺苷酸环化酶的活化需要钙调蛋白与Ca^{2+}所形成的络合物参与。这样，环化酶的活化也和Ca^{2+}的水平有关。

(三)蛋白激酶的生理功能

进一步研究得知，cAMP形成后，它的第二信使作用，即cAMP表现的各种生理效应一般都要通过蛋白激酶来完成。蛋白激酶是一种别构蛋白，通常由两种亚基——调节亚基(R)和催化亚基(C)所组成。以肌肉中获得的依赖于cAMP的蛋白激酶为例，其包含的调节亚基相对分子质量为49000和催化亚基相对分子质量为38000，当无cAMP时，调节亚基和催化亚基是以无活性的R_2C_2络合物形式存在。cAMP是蛋白激酶依赖的别构调节效应物，它能和调节亚基结合而改变其构象，导致蛋白激酶的两种组成亚基解离成R_2和两个C，使C从调节亚基的抑制控制下解脱出来，从而表现出该酶的催化活性。活化了的蛋白激酶能催化ATP上磷酸基转移到靶细胞中某些蛋白质的丝氨酸或苏氨酸羟基，促使这些蛋白质磷酸化，从而调节它们的活性。

上述这种蛋白激酶几乎存在于所有动物细胞内，所以 cAMP 能在各种动物细胞中表现出它的效应。由于 cAMP 表现的效应因激素的不同类型靶细胞而有所差异，推测蛋白激酶的底物在不同细胞中往往有所不同。

(四)肾上腺素对糖代谢调节机制实例

研究得较多的是肾上腺素对糖代谢的影响。已经知道，肾上腺素具有调控糖元合成与降解的效应。糖元是动物肌肉和肝脏内葡萄糖的主要贮存形式，当动物机体处于紧张时，肾上腺便会分泌肾上腺素，并通过血液输送到各种组织，发挥相应的生理效应。其中有促进肌糖元的分解和抑制糖元的合成。此效应就是通过 cAMP-蛋白激酶体系呈现的，即由 cAMP 活化了的蛋白激酶能使糖元合成酶磷酸化，这种磷酸化修饰会抑制该酶催化糖元合成的活性。活化的蛋白激酶还能使磷酸化酶激酶磷酸化而促使其活化，活化的磷酸化酶激酶类似于蛋白激酶，便会再催化糖元磷酸化酶磷酸化，此磷酸化则引起对糖元磷酸化酶的活化，从而促进糖元分解。

概括而言，肾上腺素首先通过受体促进 cAMP 的生成，第二信使的 cAMP 作用于蛋白激酶而使之活化，于是进一步催化两种不同酶的磷酸化，然后从两方面分别抑制糖元合成酶和活化磷酸化酶激酶来促进糖元分解。

在细胞内尚存在另一种接受 cAMP 调节的磷酸化蛋白磷酸酯酶(phosphoprotein phosphatase)，它的作用是催化三种磷酸化了的糖元合成酶、磷酸化酶激酶和糖元磷酸化酶，在 cAMP 水平下降时脱去磷酸，抑制糖元分解和促进糖元合成。于是生物体为了确保系统再次接受激素信号由 cAMP 作相应的应答，在激素信号除去后，就能立即恢复原来状态。且蛋白激酶与磷酸化蛋白磷酸酯酶之间也存在着作用上按有机整体的协调，其中还有受 cAMP 和 Ca^{2+} 调节的磷酸化酶激酶的参与。磷酸化酶激酶是 4 种亚基组成的，其中 γ 为催化亚基，δ 是结合 Ca^{2+} 的钙调蛋白，α 和 β 可由蛋白激酶催化而磷酸化，但 α-亚基被磷酸化的速度慢，时间差约 1～2min。激素对磷酸化

酶激酶的调节主要是通过使β-亚基磷酸化。β-亚基磷酸化后发生构象改变而促使该酶从无活性状态转变为活性状态;α-亚基磷酸化会促进β-亚基的构象进一步改变,导致对磷酸化蛋白磷酸酯酶脱磷酸化作用的敏感性;随后又使β-亚基脱去磷酸后回复到无活性状态。概括而言,激素通过蛋白激酶的作用使磷酸化酶激酶瞬时转入活性状态,产生相应的生理效应,然后蛋白激酶进一步作用,经一定的时间间隔后,在磷酸化蛋白磷酸酯酶的协同下,脱去磷酸化酶激酶的磷酸,使之回复至无活性状态,终止激素的效应。由此表明,激素能脉冲地呈现它的作用。

现已知道,利用成为生化过程限速环节的磷酸化和脱磷酸化反应来调节活性的酶,约有25种以上。它们的调节往往在生化过程中的每一步骤都具有生物放大效应。

此外,激素还可能通过其它功能蛋白来呈现其生理效应,这方面的机理研究得还不太清楚。在动物细胞内除了cAMP外,细胞质中尚存在浓度只不过是cAMP的十分之一的cGMP。它是由GTP经鸟苷酸环化酶催化而转变成的,又能被cGMP磷酸二酯酶作用生成GMP。cGMP引起的生理效应往往与cAMP的相反,它可减缓心肌的搏动,抑制糖的异生;cGMP还与cAMP促进Ca^{2+}从线粒体进入胞质的功能相背,它又能使细胞膜表面受体由激素等激活后,可以促使Ca^{2+}通道瞬时地打开,让细胞外Ca^{2+}进入细胞质而充当第二信使。此时钙调蛋白成为细胞内的直接信号受体,它在Ca^{2+}的调节过程中起着极为重要的作用。

钙调蛋白广泛地存在于动物和植物细胞内,具有148个氨基酸残基所组成的单肽链,在分子中有4个Ca^{2+}结合位点。它对Ca^{2+}有很高亲和力($K \approx 10^{-6}mol/L$)和选择性(相对Mg^{2+}约有1000倍以上)。当钙调蛋白和第二信使Ca^{2+}结合后,便发生明显的构象改变而进一步对它的靶蛋白产生影响,信号得到传递和放大。

现在发现,钙调蛋白的靶蛋白越来越多,有cAMP不同形式的磷酸二酯酶、环化酶、结合于膜的Ca^{2+}-ATP酶、磷酸化酶激酶和肌

球蛋白轻链激酶等。在大多数情况下，钙调蛋白是在结合 Ca^{2+} 后才转入线粒体。一般认为，cGMP 的功能似乎是参与细胞内游离钙浓度升高时引发的效应，而不像是激素作用的第二信使。当胞质 Ca^{2+} 浓度升高时会导致 cAMP 水平上升，于是活化依赖 cGMP 的蛋白激酶，然后引起相应的效应。

（五）Ca^{2+} 的第二信使作用

在正常情况下，细胞质内游离的 Ca^{2+} 浓度非常低（$\leqslant 10^{-7}$mol/L），而细胞外的 Ca^{2+} 浓度通常要高出 3 个数量级以上（$\geqslant 10^{-3}$mol/L），于是相对质膜有一个高跨膜 Ca^{2+} 浓度梯度，使 Ca^{2+} 可成为某些激素等细胞外信号分子的第二信使，对细胞内起着重要的调节作用。

除了以上提及的细胞膜表面有的受体能负责将信号传递给腺苷酸环化酶外，还有的受体和 Ca^{2+} 结合后才从游离状态转变为和靶蛋白相结合的构象，例如 cAMP 磷酸二酯酶、腺苷酸环化酶以及某些与膜结合的 Ca^{2+}-ATP 酶等的活化，就是因为和 Ca^{2+}-钙调蛋白结合产生的效应。也有些情况是钙调蛋白本来就是其靶蛋白的固定亚基，例如磷酸化酶激酶的固定亚基之一即是钙调蛋白。

靶细胞只能在钙调蛋白的靶蛋白存在情况下，对游离 Ca^{2+} 进入而浓度升高方作出响应。由于钙调蛋白结合 Ca^{2+} 数目的不同，可有不同的构象，从而与之结合的靶蛋白也可不同。于是钙调蛋白能定量地将不同细胞内的游离 Ca^{2+} 浓度转换成不同的细胞效应。

细胞内通过 Ca^{2+} 调节的效应往往在很大程度上是和通过 cAMP 调节的重叠，还有些靶蛋白（如磷酸化酶激酶）会同时受到 cAMP 和 Ca^{2+} 的调节，由此可以推论上述两种信使会彼此相互影响。

10.5.2　与细胞内受体结合进行的调节

疏水性质的激素例如甾体激素和甲状腺素，它们能以简单的扩散方式穿过细胞膜，进入细胞质或细胞核内，与其中的相应受体结合形成了激素-受体络合物，引起该别构受体发生构象上的变化，增强了它与 DNA 的亲和力，致使激素-受体络合物能穿过核孔进入细胞

核，在核内再与相应的染色质区段结合，调节相关基因的复制、转录和表达，最终导致相应的生物效应。

（一）疏水性激素与相应受体的络合物

甾体激素和甲状腺素要发挥生理效应必须首先和它们的相应受体结合形成激素-受体络合物。在这些激素的靶细胞中一般含有10000个左右的受体蛋白分子，约占细胞总蛋白的1/50000。相应的受体和激素间有很高亲和力，亲和常数K为$10^8 \sim 10^{10}$mol/L。不同激素一般都有相应的专一性受体。不过当激素达到药理剂量级水平时，有可能与其它受体出现交叉结合现象，甚至也可能出现非专一性结合。例如子宫中雌二醇受体仅能与活性雌二醇-17β结合，而几乎不能与无活性异构体雌二醇-17α结合；当地塞米松浓度达一定水平时，醛固酮受体也能和地塞米松结合，还有糖皮质激素与溶酶体膜是非专一性结合。

根据^{3}H标记的雌二醇所进行的体外实验表明，受体和激素结合后所形成的络合物增加了一个亚基，相对分子质量由80000左右变为130000，沉降系数由4S′变为5S′，它的构象改变导致对DNA的亲和力增强，同时也显著地增强了对染色质某些特定位点的亲和力。通过实验也发现，随着保温时间的延长，细胞质中激素-受体络合物逐渐地减少，而核中这种络合物却逐渐增多，说明激素与受体结合所形成的络合物能够向核内输送，而对DNA和染色质特定位点的亲和力增强，会促使这种络合物在核中积累，与染色质的结合也有利于对特定基因转录表达的调节控制和激素功能的呈现。在应用淋巴细胞瘤突变株所进行的研究中，已发现有些激素（例如可的松）与它的受体所形成的络合物不能从突变株细胞质移至细胞核，于是无法和DNA结合，因而阻碍了激素功能的实现，这表明需通过和细胞内的受体结合进行调节之激素-受体络合物，进入细胞核与染色质结合是呈现生理效应的关键步骤。例如雌酮虽能和它的受体结合，可是却不能进一步和染色质结合，所以不能呈现出刺激子宫生长的效应。

（二）调节与响应

实验发现,糖皮质激素地塞米松在肝细胞中和受体结合为络合物后,与 DNA 的专一结合位点数约每 10^6 个碱基对有一个;孕酮-受体络合物与除去组蛋白后的输卵管染色质的酸性蛋白结合位点数的增加,且只有靶细胞的酸性蛋白才会与该络合物结合等表明,孕酮-受体络合物与酸性蛋白的结合可以消除组蛋白的阻遏作用,有助于和 DNA 的进一步结合。

进一步研究得知,在许多情况下,靶细胞从响应甾体激素类的刺激到表现出生理效应过程中,包含有直接诱导少数特殊基因转录表达的初级响应,以及这些基因所表达的产物再进一步活化其它基因并产生次级响应,导致原始激素效应发生明显放大。例如以蜕皮激素注射到果蝇体内,约 5～10min 之后,它的唾液腺的巨多线染色体中有 6 个新位点的 RNA 被诱导合成并表达为相应的蛋白质,而这些新合成的蛋白质中有几种又能进而诱导 100 种左右的 RNA 转录,于是导致大群特征蛋白质的合成,呈现出相应的生理效应。在初级响应阶段所合成的新蛋白质中,有几种能反馈地阻遏初级响应,切断初级响应基因继续转录;有的还能活化 RNA 聚合酶。

激素的生理效应是多样性的,它既因靶细胞不同而异,也因激素的性质差异而不同,这是由于它们活化基因不同所引起的。以睾丸酮对性征的影响为例:据了解在通常情况下所有哺乳动物一般按雌性线系发展,只有当胚胎发育过程中有睾丸酮存在时才会向雄性发育,即睾丸酮作用不同的靶细胞会导致不同的蛋白质形成,于是表现出各种雄性性征。在正常动物体内所有靶细胞中的睾丸酮受体都相同,而各种靶细胞表达的基因产物会有不同,因而应答就表现出相应的特征性征。若患有睾丸女性化的突变性疾症,是由于睾丸酮受体异常,则这些动物不能对睾丸酮作出响应,也就不能使靶细胞各种相应的基因组正常转录和表达。

(三)细胞间的信息传递机制

高等多细胞生物的细胞间的信息传递,是生物以有机整体适应外界环境,按照必要的条件完成各种生命活动的保证。细胞间的信

息传递一般有三种方式：

(1)通过化学信号分子进行不同距离跨膜电势的联系，这是最重要、最普遍的联系方式；

(2)通过与质膜结合的信号分子以物理接触的方式与邻近细胞联系；

(3)通过细胞间的孔隙通道进行细胞质间的联系。

根据化学信号分子的产生、输送以及作用部分，它们可分为三类：

(A)局部化学调节物：如神经生长因子，它是由两条118肽链组成的；嗜曙红趋化因子，它是由4个氨基酸组成的；还有前列腺素和组胺等，它们中一种或几种可由大多数细胞分泌，仅能作用相邻的一些细胞，易被吸收和分解。

(B)神经递质：如甘氨酸、去甲肾上腺素、5-羟色胺、γ-氨基丁酸、乙酰胆碱和脑啡呔等，它们是由神经细胞的化学触突分泌，只能作用与其相连的细胞。

(C)激素：它们是由特别分化的内分泌腺细胞分泌，随后由血流输送到遍布在全身的靶细胞处，在该处发挥特定的生理效应。

这三类物质，尤其是(A)、(B)两类与(C)中某些在化学组成上甚至在作用方式上有相互类似之处，都由专一性受体将作用转换为细胞内信号，通过调节代谢、调节相应的生理效应，促使有机整体的生物协调地保证了各种生命活动。其中激素是一种分化程度更高，作用更为突出的信号分子。

结　束　语

生物的最基本生命活动即是始终不断地进行新陈代谢。新陈代谢是由一系列化学反应和物理化学过程所组成，通过这些反应和过程，消化由外界摄入的物质，转化、改造、同化成为自身需要的成分，并对自身的组成进行更新。伴随着这些反应和过程，进行能量转换、

利用、贮藏和释放。参与新陈代谢的化学反应是多种多样的，它们彼此制约又相互依赖，通常是关联在一起，从而组成一条条代谢途径，这些途径又纵横交错地织成复杂的代谢网络，从而协调地造成一个有机整体的生命活动。只有通过新陈代谢，生物方能生存、生长、繁殖和发育，也才会有遗传 和变异，才会有感应、调控和运动，方能适应外界条件的变化而进化和发展。

在生物体内新陈代谢的过程条件是十分温和的，根据生命活动的需要，代谢反应仍能按一定途径以有机整体相互联系和协同制约地高速协调进行，关键在于生物体内反应都是由酶催化，而大多数酶都需要辅助因子，尤其是辅酶物质配合，然而辅酶都是维生素的衍生物，因此，维生素和新陈代谢有着十分密切的关系。

许多疾病都是由于维生素缺乏，导致代谢途径中相关酶作用受阻，而使生理失调所引起的。如果维生素缺乏就会引起体内 α-酮酸氧化脱羧受阻，从而影响糖代谢，导致能量转换失调，造成四肢无力，甚至心力衰竭，心律加速和脚气病浮肿等病症；同时丙酮酸的积累，通过血液使脑组织中的丙酸含量超常，从而导致多发性神经炎。

激素是发挥代谢过程中调节而呈现其生理效应的。人们现已将代谢调节归纳为三种水平的调节：代谢与产物水平上的调节，其中十分重要的是反馈调节；激素水平的调节和整体水平上调节，而三者是相互关联的。它们的关键都通过酶的活性水平和含量水平的调节。如上述，激素是通过和相应的受体结合而分别影响酶的活性与酶的合成，从而影响代谢与生理活动。然而激素本身受神经因素统一支配，也受反馈协同调节。激素的分泌缺陷即造成内分泌失调，便会产生相应的病症。

第十一章　生物技术

生物技术是利用生物体如微生物中益菌、动植物细胞或其组成部分如细胞器与酶(包括基因),在最适宜的物理化学条件下,进行有益的生物化学过程而获得有价值产物的技术。

进行生物技术工作,需要运用传统的选培菌种、细胞融合和基因工程等方法以获得优良性状的菌种(克隆),并对其生理研究和生长及产物形成的动力学研究,了解菌种的营养需求,最适宜的培养基和培养以及控制条件等,这就需要基础学科知识的配合,例如物理化学基础理论和实验技术早已成为生物技术的基础。

11.1　微生物与动植物细胞的培养

11.1.1　微生物培养对营养的需要

有益的微生物在人类从事的工业生产中,摄取营养分,通过体内特定的酶系,将原料经复杂的生物化学过程而变为人类需要的产品,如酒类、抗生素、氨基酸、柠檬酸和醋等有机酸、维生素等等。其中生产谷氨酸的有北京棒状杆菌,生产丙酮-丁醇的有梭状芽孢杆菌,生产乳酸的有乳酸杆菌;据统计放线菌类生产的常用抗生素有链霉素、土霉素、四环素、金霉素、红霉素、氯霉素、庆大霉素、卡那霉素等;在发酵工业中常用酿酒酵母菌属和假丝酵母菌属,前者可用于酒精和各种酒类,后者可应用于石油发酵脱蜡,还能生产柠檬酸和脂肪酸,甚至食用蛋白质;有益的霉菌也能用于发酵工业,生产酒精、有机酸、抗生素、维生素、激素和酶制品(如豆腐乳)等多种产品。在中国远古时代已利用霉菌做曲制豆酱。

微生物为生存与繁殖,需要从周围环境的营养物质中获得各种

养分，人工培养所配制的含这些营养物质的介质，通称为培养基或培养介质。培养基可以配成液体、固体（加入1.5%～2.0%）的琼脂，有的不用琼脂如制酱用的是豆和面粉）或半固体（加0.2%～0.5%琼脂）。各种微生物所需的营养物质有很大的差异，从微生物细胞内的化学成分可以推测出微生物生长时对一些营养物质需求的一般规律，从而可以设计和配制相应的培养基。

培养微生物一般皆需碳源、氮源和各种无机元素（如磷、硫、镁、钾、钙等），有些尚需要维生素，所以培养基的配制基本上应含有水分、碳源、氮源、无机盐和维生素等五大类物质。

（一）碳源

培养微生物最常用的碳源是糖类物质，实验室是以葡萄糖为碳源，在工业生产中可由玉米粉经糊化后得到的淀粉为广泛常用的碳源。此外，还可使用由其它谷物、马铃薯、木薯等得到的糖类物质。一般，淀粉尚需经酸法或酶法水解，制成通常的寡糖或葡萄糖等的各种糖，化液后，方可供培养微生物或发酵使用。生产食糖时的结晶母液（甘蔗糖蜜或甜菜糖蜜）也可作为微生物发酵的碳源。大麦经润湿保温发芽后便含有淀粉和多种可供微生物摄取的糖分。工业植物油（橄榄油、玉米油、亚麻子油、棉籽油、豆油等）也常配制到培养基中，起着消泡的表面活性剂作用，又可成为部分碳源。

将醇类，简单有机酸或烷烃作碳源也得到开拓。英国ICI公司已将甲醇用于大规模生产单细胞蛋白质（scp）的原料，石油和天然气也正在活跃地被研究代替糖类物质，由微生物利用以生产菌体蛋白、有机酸、氨基酸、维生素、核苷酸、抗生素和酶制剂等。

纤维素或半纤维素，如玉米蕊、秸秆、稻草、木屑等经酶法、酸法或辐照法等处理后，转变为糖类，可用于发酵生产或培殖菌种。

（二）氮源

氮源在微生物培养过程中是仅次于碳源的另一种重要元素，它一般不会提供能量（消化细菌除外）给微生物，而是构成微生物细胞、蛋白质和核酸的主要元素。

微生物需要的氮源可从无机或有机两类获得，无机的氮源有氨、铵盐或硝酸盐等，其中铵盐利用得较多，与豆科植物共生的根瘤细菌能利用分子态氮(N_2)；有机的氮源有氨基酸、蛋白质或尿素等，部分水解的蛋白质(蛋白胨)是比纯蛋白质有较良好的氮源效果。实验室培养基常用的有蛋白胨、牛肉膏等，工业生产中使用的有硫酸铵、尿素、黄豆粉、花生粉、麸皮、鱼粉等，例如，生产次级代谢产品青霉素时主要的氮源是玉米浆、生产维生素 B_2 的主要氮源是明胶水解液，生产新生霉素使用的是酒糟水，生产利福霉素时主要氮源是黄豆粉和硫酸铵，赤霉素生产中使用的是铵盐和天然植物氮源。

(三)无机元素

某些无机元素是微生物生命活动所不可缺少的物质，它们是构成菌体的成分，可以调节体内 pH，没有它们则酶基团常会失去活性，无机元素包括两类——主要元素和微量元素。主要元素为磷、硫、镁、钙、钾等，通常在配制培养基时加入。微量元素为钴、铜、铁、锰、钼和锌等，但需要量极微。无机元素对微生物生长的影响很复杂，在浓度适当时对微生物有维护生长的作用，而浓度过高时反而对微生物的生长造成不良影响。

(四)维生素

维生素是生物生长所不可缺少的微量有机物质。微生物生长时需要外界提供维生素，与微生物关系较密切的主要是 B 族维生素，它们是微生物细胞各种酶活性基团的辅助因子，没有它们，酶便缺乏活力。例如 B_{12}(钴胺素)是协同酶参与微生物细胞内分子重排反应的金属有机络合物，大多数细菌都需要它。一种 B 族维生素泛酸是乳酸菌生长时所必需的。微生物对维生素的需要量极微，但对生物正常生长的影响却是重要的。天然的碳源和氮源中，往往均含有多种维生素。

(五)氧气

需氧微生物在培养时务必不断地向培养基通入氧气，无菌空气中的氧气是氧元素的主要来源，缺氧将使需氧微生物丧失活力，进而

死亡。关于氧气的供应涉及空气在培养基中溶解规律，即在一定温度和平衡状态下，气体在液体里的溶解度（以摩尔分数表示）和该气体的平衡分压成正比，此规律称作亨利定律，表示式为

$$P_i = k_x x_i \tag{11.1-1}$$

式中 P_i——代表 i 气体在平衡时液面上的分压；

x_i——代表所溶解的 i 气体在溶液中的摩尔分数；

k_x——代表以摩尔分数表示溶解气体的亨利常数，其数值取决于温度、压力、溶质和溶剂的性质。

亨利定律公式也可由定温定压下，i 组分在气相与液相分配达平衡时化学势相等〔即 μ_i（溶液）= μ_i（气相）〕的热力学条件下导得（可参阅物理化学著作）。

对于稀溶液，上式可简化为

$$P_i = k_x \frac{n_i}{n_i + n_o} \approx k_x \frac{n_i}{n_o} = k_x \frac{n_i M_o}{W_o} \tag{11.1-2}$$

式中 n_o——代表溶剂的量，摩尔；

n_i——代表溶解的 i 气体的量，摩尔；

M_o——代表溶剂的相对分子质量；

W_o——代表溶剂的质量，千克。

若所用溶剂的质量为 1000 克（其它溶质假设都可略而不计），则 $\frac{n_i}{W_o}$ 即等于质量摩尔浓度（m），所以上式又可写成

$$P_i = k_m m \tag{11.1-3}$$

该亨利定律公式仅适用于总压力不大的混合气体，i 气体分压与其它气体存在无关，而 i 气体在气相和在溶剂中的分子状态必须相同，溶液浓度越稀就越准确。

11.1.2 动、植物细胞的培养

动、植物细胞的培养有其自身的特点，因此用于动、植物细胞培养的培养基要比培养微生物所用的复杂得多，条件也较严格。

（一）动物细胞的培养

在培养动物细胞时，培养液中除了基本需要的无机盐、氨基酸、维生素、核苷酸、激素、甾类化合物和脂肪酸等之外，往往还要加抗生素以减少微生物引起的污染。同时需加动物血清促进细胞的繁殖。不过，近年来为减少加血清的麻烦，开发出无血清培养基。动物细胞的培养也需少量的氧气。

大多数动物细胞在生长时具有附壁生长的依赖性（Anchorage-dependent），它们必须附在适当的固体表面上才能正常繁殖，它们被称为附壁型细胞。因此，对这类细胞培养所用设备必须特殊设计。由于它们没有细胞壁（只有膜），易受机械损伤，于是反应器中搅拌器及其搅拌强度也必须适当。

（二）植物细胞培养

用于植物细胞培养的基本营养成分是蔗糖或葡萄糖等碳源及能源，还有无机盐（如含钾、含磷等盐）。往往在培养基中再加入如植物激素、维生素、氨基酸及糖肌醇等物质，作为植物生长调节因子以加快植物细胞的生长。培养的细胞通常是切开植物器官经冲洗和灭菌后所得的植物组织。培养时除了上述适当的养分外，植物细胞的繁殖也还必须向系统通入无菌空气以满足氧气的需要。

动、植物细胞培养中可发挥多种重要功能。例如在细胞生长代谢过程中可进行生物转化，从而生产有用的物质。通过动物细胞培养已能获得病毒疫苗，单克隆抗体干扰素、激素、免疫制剂或某些酶制品；通过植物细胞培养也能获得地谷新（一种重要的强心药物），它是植物毛地黄细胞培养，使其中的毛地黄毒素经 1,2-β 羟基化制得。利用植物细胞培养后再经分子合成尚能制得多种次级代谢物，包括多种药物、染料、除虫菊酯、香草或茉莉花香精等。

11.1.3 细胞培养与基因工程和遗传工程

微生物、动、植物的培养还为微生物基因工程和植物遗传工程提供条件，现在的基因工程一般是通过微生物（如大肠杆菌、E. coli）来实现。首先利用限制性内切核酸酶把某种目的基因自培养所得细胞染色体中剪切下来，再由核酸连接酶将切下的目的基因“嫁接”至载

体(如从大肠杆菌中分离出来的质粒或噬菌体)的 DNA 上,然后将含有目的基因的重组 DNA 分子导入寄主细胞(如大肠杆菌细胞)内,使目的基因能在寄主细胞内通过复制—转录—按三联体密码转译,从而得到不断地增殖和表达。人胰岛素生产就是这一代表性例子,即从人胰脏细胞内获得的 DNA 片段经一系列基因工程的技术操作,得到所需目的基因 DNA 片段并重组到自大肠杆菌分离出来的质粒载体上,然后再将此重组质粒导入大肠杆菌内,从而得到能生产人胰岛素的大肠杆菌。培养这种大肠杆菌(通称工程菌)便能获得基因表达,以生产人胰岛素。这方法已于 1980 年在美国获得成功,并将产品“秀吗啉”(Humulin)投入市场。目前运用基因工程进行商品化生产的产品,还有人生长激素、干扰素等。

动、植物细胞基因工程的研究也早已开展,这为利用植物遗传工程方法来改良谷类植物性能而求得增产,提供了一种有效的技术。利用植物细胞的组织培养可不受天时、地理等因素的限制,从而能强化生产。

11.2 细胞培养过程动力学

培养过程的动力学是研究细胞生长繁殖、基质的消耗和生成产品等规律的科学。通过培养过程动力学研究,可进一步了解培养过程中所发生的极为复杂的生化反应,从而能拟定出更好的培养方案,以便有效地获得繁殖的细胞,或者在生化处理中更有利于除去某些物质,或者在利用细胞的某种酶催化特定反应时,能更多地获得各种代谢产物。一般在工业上使用液体培养基对培养纯种和易控制操作方面,优于固体培养基,所以多数工业在细胞培养过程都采用液体培养基。

根据细胞习性,液体培养时,有的细胞在液面生长繁殖,特别是需氧菌常在接触空气的液面上形成表面膜状繁殖,这就成为表面培养;有的依赖于培养基浸没的空器壁面上生长繁殖成附壁膜;有的细

胞以悬浮姿态在液体培养基中生长繁殖，这种细胞可以深层培养，对于好气性细胞进行深层培养时，必须在液体培养基中通入无菌空气，来满足细胞对氧的需求。

培养过程的操作方式可采用分批培养、连续培养和半连续培养等。分批培养是指培养基灭菌、接种后，保证适当条件，在培养过程中不再补充养分的间歇培养操作；连续培养是将新鲜培养基不断地加入生物培养反应器中，并不断地取出培养物的操作方式。它们各有生化反应动力学特点。半连续操作是培养时可陆续补充培养基，在培养过程中间歇地取出部分培养物，或在培养终止时全部取出培养物，它的操作方式介于前二者之间。以下对深层培养方法进行探讨。

11.2.1 深层分批培养过程

深层分批培养是在生物反应器中装入液体培养基后一起灭菌，或在灭菌生物反应器中加入灭菌培养基，在严禁带入杂菌的情况下，于适当的温度时接种，保证一定的条件下进行培养，好气细胞培养需在接种后就开始通入无菌空气。若培养过程还需消除泡沫时则要添加消泡剂，此外为了保持一定的 pH 值要添加酸或碱。待生化反应进行到一定程度后，即将全部培养液放出，进行后处理。

在分批培养过程中，细胞、营养物质和产物等浓度均不断地发生变化。细胞浓度变化的一般规律是存在延迟期、指数生长期、静止期和衰亡期等阶段。

(一)延迟期(Lag phase)

细胞在环境改变后往往需要一个适应阶段，在新培养基中含较丰富的新营养物质、配制时可能的 pH 偏差、及某些离子(如镁)或小分子辅助因子(如辅酶)的物质浓度原因等所造成的新环境下，离开旧的生存环境而“休眠”的细胞，需自身调节以恢复细胞内酶催化新陈代谢反应和复制-转录-转译的活力。这段一定时间内正在“复苏”的细胞不可能立即生长繁殖，细胞浓度无明显增加，细胞浓度对数值与培养时间的曲线关系近于平坦，此阶段称为延迟期。

延迟期的长短与接种种子的种龄有很大关系，存放时间短的种子，其延迟期较短，种龄越老其延迟期也越长。实际上，休眠细胞内还会有缓慢的新陈代谢而趋于衰老的活动，所以一般说影响延迟期的因素还是较复杂的。

（二）指数生长期（Exponential growth phase）

细胞"复活"后的一段时间内，培养基中的营养物质较充分，细胞的生长不受限制，细胞浓度随时间呈指数增长，几乎呈斜率很大的细胞浓度对数值与培养时间的直线关系，可称指数生长期，简称对数期（log phase）。此培养阶段，细胞浓度的增长速率与细胞浓度成正比，即

$$\frac{dx}{dt} = kx \qquad (11.2\text{-}1)$$

式中　x——代表细胞浓度（kg/m^3 或个$/m^3$）；

t——代表时间（s）；

k——代表比生长速率（s^{-1}，相当于一级反应的速度常数。

（11.2-1）式可改变表达形式为

$$k = \frac{1}{x}\frac{dx}{dt} \qquad (11.2\text{-}2)$$

比生长速率 k 与细胞种类、培养温度、pH、限制性基质浓度等有关。

在指数生长阶段，比生长速率因细胞生长不受限制而可达到最大值 k_m 并保持不变。若 t_1 时细胞浓度为 x_1，则 t_2 时细胞的浓度为

$$x_2 = x_1 \exp[k_m(t_2 - t_1)] \qquad (11.2\text{-}3)$$

即细胞浓度对数值随时间的变化可得一直线，其斜率与最大比生长速率成正比，即

$$k_m = 2.303\log(x_2/x_1)/\log(x_2/x_1)/(t_2 - t_1) \qquad (11.2\text{-}4)$$

使用倍增期 t_d 表达（即细胞浓度增长一倍所需的时间，又称倍增时间 doubling time 或称增代时间 generation time），则

$$t_d = \frac{\ln 2}{k_m} = \frac{0.693}{k_m} \qquad (11.2\text{-}5)$$

微生物细胞的 k_m 较大，倍增期约为0.5～5小时，动植物细胞的 k_m 小得多，所以 t_d 对动物细胞来说约为15～100小时，而植物细胞的 t_d 约为24～74小时。

（三）静止期(stationary phase)

随着细胞的生长繁殖，培养基中的营养物质被消耗，一些有害的代谢产物也在培养液中积累，细胞的比生长速率逐渐下降，最终导致细胞浓度不再增加，此阶段为静止期，细胞的浓度达到了最大值。

由于营养物质的消耗造成细胞比生长速率的下降可以通过动力学分析，来估计分批培养可能达到的最大细胞浓度。设浓度为a的限制性基质A，其消耗速率与细胞浓度成正比：

$$-\frac{da}{dt}=K_a x \tag{11.2-6}$$

式中 K_a——代表A消耗速率与细胞浓度的比例常数。

倘若接种后的培养液中之细胞浓度为 x_0，而A的浓度为 a_0，且立即进入指数生长阶段，直至静止阶段，则

$$x_m = x_0 \exp(k_m t) \tag{11.2-7}$$

式中 x_m——代表分批培养达到的最大细胞浓度，也是A完全耗尽时的细胞浓度。

由(11.2-6)式和(11.2-1)式可得

$$a_0=\frac{K_a}{k_m}(x_m - x_0) \tag{11.2-8}$$

整理后即成

$$x_m = x_0 + \frac{k_m}{K_a}a_0 \tag{11.2-9}$$

此式说明，分批培养能获得的最大细胞浓度与限制性基质初始浓度存在着线性关系。例如好气气杆菌(假单胞菌)在分批培养中可得到的最大菌体浓度与培养基中限制性基质果糖浓度关系见图11-1。

如果细胞比生长速率的下降是由于代谢产生有害物质的积累而抑制造成的，假定细胞生长速率下降与有害物质浓度呈线性关系，即

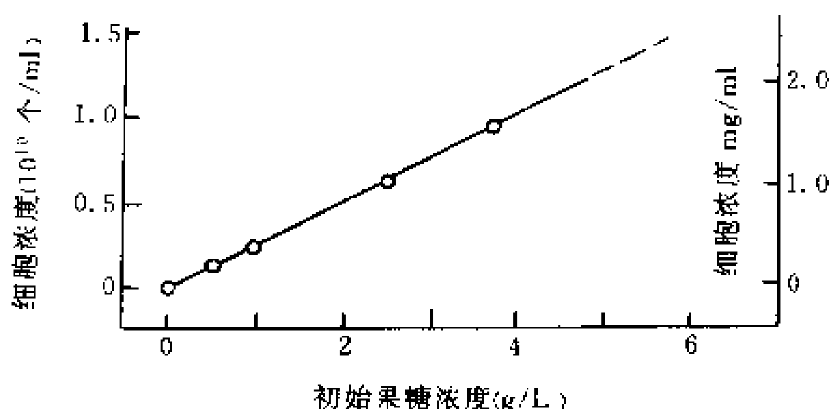


图 11-1　分批培养中假单胞菌最大浓度与限制性基质果糖初始浓度的关系

可表达为:

$$\frac{dx}{dt}=Kx(1-bC_i) \tag{11.2-10}$$

式中　K、b——代表常数;

C_i——代表有害物质浓度。

由于有害物质是细胞在代谢过程中产生的,可以认为 $t=0$ 时,$C_i=0$,其动力学速率方程为

$$\frac{dC_i}{dt}=qx \tag{11.2-11}$$

式中　q——代表常数。

由(11.2-11)的积分式

$$C_i=\int_0^t qxdt \tag{11.2-12}$$

代入(11.2-10)式而得

$$\frac{dx}{dt}=Kx(1-b\int_0^t qxdt) \tag{11.2-13}$$

根据(11.2-2)式有效比生长速率为

$$k_{ef}=\frac{1}{x}\frac{dx}{dt}=K(1-bq\int_0^t xdt) \tag{11.2-14}$$

上式表明 k_{ef} 随时间急速地下降，当$\frac{1}{bq}=\int_0^t xdt$时，细胞便不再生长了。

(四)衰亡期(Death phase)

由于分批培养的培养液内容在一定培养时间后就恶化，于是细胞开始死亡而进入衰亡期，活细胞浓度下降，所以分批培养大多数应在进入衰亡期前结束。

在衰亡期中活细胞浓度为

$$x = x_m \exp(-at) \tag{11.2-15}$$

式中　a——代表比死亡速率(s^{-1})；

t——代表进入衰亡期后经历的时间。

11.2.2　细胞浓度的测定

在培养过程的动力学研究中，细胞浓度必须通过各种手段进行测定。如果培养目的是在生产细胞，培养液中产物浓度便是细胞浓度；如果培养目的是生产细胞的代谢产物或除去液体中的某些物质，则细胞浓度即是生物催化剂的浓度，所以细胞浓度是培养过程的极重要基本参数。对于生物细胞浓度的测定有其特殊的方法。

(一)细胞干重法

细胞干重法是直接测定细胞浓度的最基本方法。通常的操作是量出一定体积的培养液经离心，收集细胞，洗涤，干燥，然后称重。本法不适用于含其它不溶性物质或酸不溶性物质。例如豆饼粉、花生粉、玉米浆等物质是无法与细胞完全分离的。

(二)显微计数法

利用显微镜和血球计数器，可直接测定单位体积培养液中的细胞个数。这是一种血球统计方法在测定细胞生物体数量方面的应用。血球计数器是一块特制玻璃板，板中间有二个刻有方格的平台，与上面可盖的平薄玻片距离为0.1mm，每个平台中间都刻有400个小方格，每16或25个小格归一大格，总面积为1$(mm)^2$。当测定细胞操作时，将经过正确的稀释培养液滴入，并使无气泡地充满平台和

盖玻片间的空隙，通过显微镜观察统计任选的多个大格中细胞的个数(一般统计均布平台的五或四大格)，乘以化为 $1cm^3$ 培养液的系数，计算出培养液中细胞浓度(个细胞/ml)，最后乘以稀释倍数即可获得每毫升的原培养液中细胞个数的信息。这种方法不适用于缠附一起的生物体细胞的计数，且还不能分辨活细胞和死细胞。凡含微小细胞(如细菌)的培养液，一般高倍显微镜也难以胜任，因为它的观察液体深度的能力极小。

(三)培养皿平板计数法

此法是将微生物培养液样品用无菌生理盐水(0.9%)进行一系列稀释，每次稀释至$\frac{1}{10}$(即一个数量级)，使稀释倍数能让在培养皿平板上经培养长出的菌落达到可数的程度。此时取一定量的稀释后液体均匀地涂布在培养皿中经灭菌的琼脂平板培养基上，经一定时间培养，根据平板上长出的菌落数、涂布的稀释液体积和稀释倍数可估计出原培养液样品中微生物浓度。培养液的确切稀释程度对测定结果影响极大。一般需要取相邻几个不同稀释度的培养液在皿板上培养作对照校核。此法常用于细菌、酵母等单细胞微生物培养液或微生物的孢子悬浮液，不适用于丝状微生物的计数。进行培养皿平板计数，必须让细胞均匀分散涂布方能得到可靠的结果。

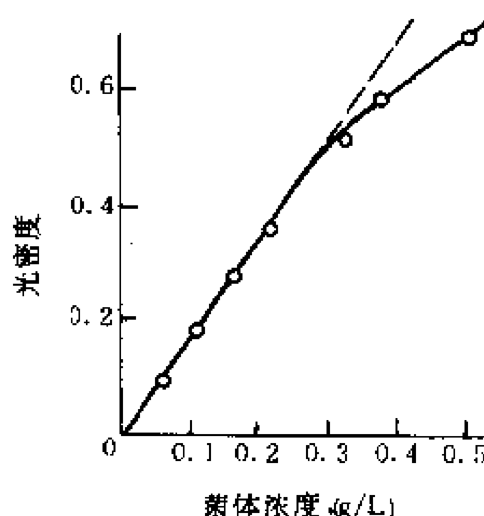


图 11-2 培养液中细菌浓度与光密度的关系

(四)浊度法

如果培养液的浊度或光密度与其中的细胞浓度成正比，则可通过比浊测定培养液中的细胞浓度。比浊测定时常用的波长范围为

600～700nm。浊度法是一种常用的测定细胞浓度的快捷简便方法，但只有在较低的细胞浓度时，其光密度才与细胞浓度有线性关系（见图11-2）。

对于含细胞较浓的培养液，应先将其稀释后再行比浊。在选定的测试浓度下，培养液中必须无其它吸收光线的物质或没有大量不溶性物质，否则会参与光遮挡。含丝状微生物的培养液，需先将微生物破碎才能比色。

（五）间接测定细胞浓度法

（1）测定构成细胞的大分子组分（如蛋白质、RNA、DNA等）来确定细胞浓度。经分批培养过程细胞中各组分的含量测试，发现菌体内DNA含量变化最小且有一段几乎平坦的浓度-培养时间曲线，RNA也有一段几乎平坦的曲线。于是可以认为培养过程各个菌体中含DNA量（或含RNA量），在一定时间内保持不变，则测定培养液中DNA（或RNA）含量变化，可以表征菌体浓度的变化，从而利用此法来估计细胞浓度。此外，应用荧光素测定细胞中ATP的量，也可确定培养液中活细胞的浓度。

（2）测定培养液中细胞的虚体积以估计细胞浓度。此法是一定体积的培养液，通过一定转速的离心，一段时间后，细胞沉降堆集一起形成细胞虚体积，即能以虚体积来获得细胞浓度信息。如果培养液中含有密度较大的不溶性培养基组分，在进行离心时会优先沉降，于是较易与细胞区分开。将沉积的固相总体积扣除不溶性物质体积后，便可估计出细胞的虚体积。此法虽不太精确，但了解细胞浓度变化信息较快速，因此，常用于复合培养基的发酵过程中，以估计发酵液中菌体浓度的变化。

（3）粘度法

如果培养液符合牛顿流特性，就可利用培养液粘度与其所含细胞浓度的关系式获得细胞浓度信息。当细胞接近球形时有

$$\eta/\eta_0 = 1 + 2.5\phi_i + 7.349\phi_i^2 + \cdots \qquad (11.2\text{-}16)$$

式中　η——代表含细胞的培养液粘度；

η_0——代表培养液中液体介质的粘度；

ϕ_i——代表 i 细胞的体积分数。

在已知培养液的粘度与细胞浓度关系(或 η 随细胞浓度变化的曲线)的条件下，测定培养液的粘度便能求出细胞浓度。

当细胞浓度较高时，或者细胞呈丝状或结成团块，则培养液往往表现出非牛顿流性质，(11.2-16)式便不能适用。

除了以上间接测定的方法外，还可利用营养物质的消耗、代谢产物的生成，或生物化学反应的反应热等来表征细胞生长的情况。细胞浓度的测定方法很多，需根据实际情况选用。

11.2.3 影响比生长速率的因素

(一)营养物质的影响

作为基质的营养物质之种类和浓度均会影响细胞的比生长速率。在指数生长期，比生长速率保持不变，而基质浓度发生很大变化，当某种基质浓度下降到一定程度，成为限制性基质时，比生长速率下降，指数生长阶段结束。Monod 提出微生物的比生长速率与限制性基质浓度 C_S 的关系式为

$$k = k_m \frac{C_S}{K_S + C_S} \tag{11.2-17}$$

式中 k_m——代表最大比生长速率(s^{-1})；

C_S——代表限制性基质浓度(kg/m^3)；

K_S——代表饱和常数(kg/m^3)，其值等于比生长速率恰为最大生长速率的一半($k = \frac{1}{2} k_m$)时的限制性基质浓度(kg/m^3)。

当 $C_S < 10K_S$ 时 k 随 C_S 发生明显的变化，而 $C_S > 10K_S$ 时 k 越趋近于 k_m。从表 11-1 列出的一些微生物 K_S 值可知，微生物的 K_S 值一般都很低，说明分批培养过程细胞的生长，消耗基质而使其浓度不断下降，在一段时间内比生长速率仍然可趋近 k_m，以保持指数生长。

表 11-1　一些细胞的饱和常数 K_S

细　　胞	限制性基质	$K_S(10^{-3}kg/m^3$
大肠杆菌	葡萄糖	0.068
	甘露醇	2.0
	乳糖	20
	PO_4^{-3}	1.6
曲霉	葡萄糖	5.0
假丝酵母	甘油	4.5
	氧	0.45
酵母	葡萄糖	25
假单胞菌	甲醇	0.7
	甲烷	0.4
克雷伯氏菌	二氧化碳	0.4
	Mg^{+2}	0.56
	K^+	0.39
	SO_4^{-2}	2.7
烟草细胞	葡萄糖	250
	果糖	940

Monod 方程已得到广泛的应用,并在许多情况下都能得到满意的结果。除此之外,还有不少学者针对某些情况提出各种方程(参见表 11-2),以描述细胞比生长速率与限制性基质的关系。然而,有时在培养基中某种基质浓度高到一定程度情况下,会表现出基质的抑制作用,细胞的比生长速率随该基质浓度的升高反而下降,导致几乎没有静止期。表 11-3 列出一些描述基质抑制的动力学模型,对于模型公式(11.2-25),当限制性基质浓度等于$\sqrt{K_SK_I}$时,细胞的比生长速率最大,为 $k_m/(1+2\sqrt{K_S/K_I})$。

表 11-2　单基质限制的生长动力学模型公式

提出人	模型公式	
Monod	$k=k_m[C_S/(K_S+C_S)]$	(11.2-17)
Teisseir	$k=k_m[1-\exp(-C_S/K_S)]$	(11.2-18)
Moser	$k=k_m[C_S^n/(K_S+C_S^n)]$	(11.2-19)
Contois, Fujimoto	$kc=k_m[C_S/(K_SX+C_S)]$	(11.2-20)
Powell	$k=k_m\left[\dfrac{C_S}{(K_S+K_D)+C_S}\right]$	(11.2-21)
Blackman	$k=k_m(C_S/2K)$　　$(C_S<2K)$	(11.2-22a)
	$k=k_m$　　$(C_S>2K)$	(11.2-22b)
Dabes	$C_S=kK+\dfrac{kK_S}{k_m-k}$	(11.2-23)
Kone, Asai	$\dfrac{dx}{dt}=k\phi X$	(11.2-24)
	延迟期 $\phi=0$	
	指数期 $\phi=1$	
	减速期 $\phi=\dfrac{X_C}{X_m-X_C}\cdot\dfrac{X_m-X}{X}$	

K_D:扩散阻力常数;X_m:最大细胞浓度;X_C:从指数生长期转为减速期时的细胞浓度

表 11-3　基质抑制模型公式

提出者	模型公式	
Andrews, Noack	$k=k_m\left(1/\left(1+\dfrac{K_S}{C_S}+\dfrac{C_S}{K_I}\right)\right)$	(11.2-25)
	$\doteq k_m\dfrac{C_S}{K_S+C_S}\cdot\dfrac{1}{1+(C_S/K_I)}$	
Webb	$k=k_m\left(C_S\left(1+\dfrac{\beta C_S}{K'_S}\right)\Big/\left(C_S+K_S+\dfrac{C_S^2}{K'_S}\right)\right)$	(11.2-26)
Yano	$k=k_m\left\{1/\left(1+\dfrac{K_S}{C_S}+\sum_j\left(\dfrac{C_S}{K_I}\right)^j\right)\right\}$	(11.2-27)

续表

提出者	模型公式	
Aiba	$k = k_m \frac{C_S}{K_S + C_S} \exp\left(-\frac{C_S}{K_I}\right)$	(11.2-28)
Teissier 型	$k = k_m \left[\exp\left(-\frac{C_S}{K_I}\right) - \exp\left(-\frac{C_S}{K_S}\right)\right]$	(11.2-29)
Webb	$k = k_m \frac{C_S \cdot \exp(1.17\sigma)}{C_S + K_S(1 + \frac{\sigma}{K_I})}$	(11.2-30)
Tseng, Waymann	$k = k_m \frac{C_S}{K_S + C_S} - K_I(C_S - C_C)$	(11.2-31)

K_I:抑制常数;σ:离子强度;C_C:基质临界浓度。

(二)温度影响

温度对细胞体内各种生物化学反应的速率有很大影响,导致对细胞的生长繁殖速率的影响也很大。一般动物细胞的培养温度为31℃~39℃,植物细胞培养的适宜温度在25℃~30℃。微生物培养生长的温度:对于低温菌(例如发光细菌、假单胞菌)的生长,最适温度范围为10℃~20℃,最低温度为0℃~10℃,最高温度为25℃~30℃;对于高温菌(例如嗜热脂肪芽孢杆菌)生长的最适宜温度范围为50℃~60℃,最低为25℃~45℃,最高为70℃~80℃;中温菌(例如酵母、霉菌、放线菌、大肠杆菌等)生长的最适温度为20℃~40℃,最低为0℃~7℃,最高为40℃~45℃。当培养温度偏低,细胞的生长速率较慢,随着温度的升高,生长速率会增快,但当超出一定温度范围后造成蛋白质等细胞结构物质变性而导致生长速率急速下降,甚至细胞死亡。

细胞的最适宜生长温度不一定就是其代谢产物的最佳生产温度,生产某一代谢产物时,常在培养过程的前期控温中,采用有利于细胞生长的最适宜温度,待细胞浓度达到一定水平后再转为该代谢产物的最佳生产温度。

图11-3举出三种典型微生物的比生长速率随温度变化曲线,从

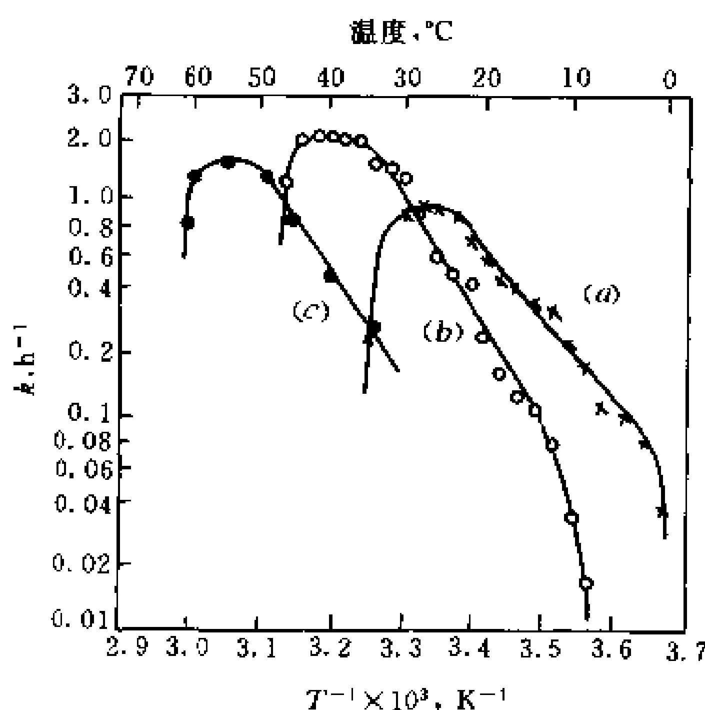


图 11-3　微生物比生长速率与温度的关系
(a)低温菌(假单胞菌);(b)中温菌(大肠杆菌);(c)高温菌(环状芽胞杆菌)。

图中发现有一些微生物,在一定温度范围内,比生长速率与温度的关系似乎符合阿累尼乌斯定律(lnk 与 1/T 有一段线性关系)。但当温度较高时,比生长速率急速下降。由此可知,采用高温菌于生产中有其优点,它们所生产的一些酶热稳定性较好,可以在较高温度下培养,细胞的生长速率较快,不易发生污染,并节约冷却水而减少动力消耗等。对于生产细胞的过程,温度会影响细胞对基质的得率系数(见图 11-4),因此控制好培养温

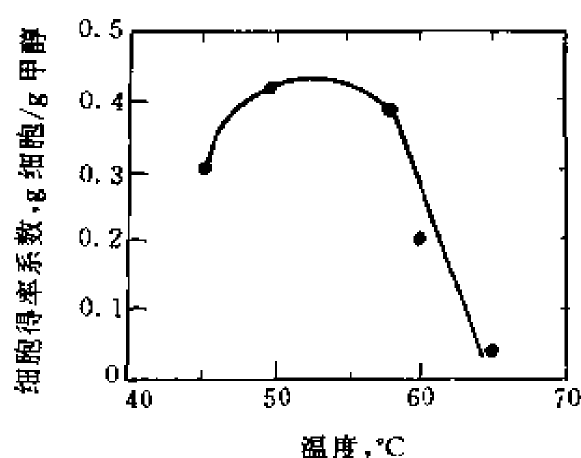


图 11-4　菌体对甲醇的得率系数与温度的关系

度有利于提高细胞的收得率。

(三)pH 的影响

pH 也是影响细胞生长的一个极其重要的因素。一般,细菌在中性或弱碱性条件下生长良好,所以对于微生物,能生长的 pH 范围较宽,约 3～4 个 pH 单位,最适宜 pH 范围是在 1～2 个 pH 内。然而酵母和霉菌喜酸性,乳酸菌和醋酸菌等在低 pH 环境下仍有很好耐酸性。

pH 对动物细胞的影响极其敏感,一般最适 pH 值要求在 7.0～7.5,波动小于 0.1 个 pH 单位。在实践中往往以调节通入 CO_2 流量或滴加氨水来调整培养液的 pH 值。

(四)其它物质的影响

除了上述三种主要又普遍的影响因素外,尚有些针对性的影响因素,例如细胞的一些代谢产物,有的会反馈抑制细胞的生长,如酵母产生的乙醇会抑制酵母的生长,乳酸菌生产的乳酸会抑制乳酸菌的生长,表 11-4 列出了一些关于产物抑制的模型公式。

表 11-4　产物抑制模型公式

提出者	模型公式	
Dagley, Hinshelwood	$k=k_m\dfrac{C_S}{K_S+C_S}(1-KP)$	(11.2-32)
Hozberg	$k=k_m-K_1(P-K_2)$	(11.2-33)
Ghose, Tyagi	$k=k_m(1-P/P_m)$	(11.2-34)
Aiba, Shoda	$k=k_m\dfrac{C_S}{K_S+C_S}\exp(-KP)$	(11.2-35)
Jerusalimsky	$k=k_m\dfrac{C_S}{K_S+C_S}\cdot\dfrac{K_{IP}P}{K_{IP}+P}$	(11.2-36)
Bazua, Wilk	$k_m=k_o-K_I\overline{P}(K_2-P)$	(11.2-37)
	$k_m=k_o(1+\overline{P}/P_m)^{\frac{1}{2}}$	(11.2-38)

续表

提出者	模 型 公 式	
Levenspiel	$\frac{dx}{dt}=K_{ob}\frac{C_S}{K_S+C_S}X$	(11.2-39)
	$K_{ob}=K(1-P/P_m)^n$	(11.2-40)
Hoppe, Hansford	$k=k_m\frac{C_S}{K_S+C_S}\frac{K_{IP}}{K_{IP}+[Y_{P/S}/(C_S-C_o)]}$	(11.2-41)

P:产物浓度;P_m:产物允许浓度,高于该浓度细胞不能生长;

K_{IP}:产物抑制常数;k_c:无产物时的比生长速率;

C_o:限制性基质初浓度。

倘若好气细胞在培养过程需要分子态氧作为电子传递反应的最终受体,则在培养过程不断地向培养液通入的氧不足时,会造成溶解氧浓度未能高于临界浓度,便会影响细胞的呼吸,从而影响细胞生长。对于生物反应中,不同产物的生产过程需氧的要求有很大差异,有的要求维持较高的溶氧浓度,而有的却在较低溶氧浓度下方有较高的产品得率。因此务必根据生物反应的特点,来控制培养液中的氧浓度,以便得到较高的该产品得率。

11.2.4 含重组 DNA 质粒的微生物分批培养

基因重组微生物所含重组 DNA 质粒常在培养中呈现不稳定性,据发现有两种形式的不稳定性,一种是重组 DNA 质粒的离析,称为分裂性不稳定(Segregational instability);另一种是重组 DNA 质粒中编码产物的基因结构发生突变,称为结构性不稳定(Structural instability)。质粒的不稳定性使培养液中具有生产能力的细胞的比例逐渐下降,从而对生产产生了很大的影响。

假定分批培养时,基因重组微生物仅出现了分裂性不稳定性。设带重组 DNA 质粒的细胞浓度为 x^+,离析质粒而失去生产某特定产品的细胞浓度为 x^-,它们的最大比生长速率分别为 k_m^+ 和 k_m^-,带有重组 DNA 质粒的细胞在培养生长过程中质粒离析而丧失作用的概率为 p,则在培养过程中两种细胞浓度的变化率分别为:

$$\frac{dx^+}{dt} = k_m^+ \frac{C_S}{K_S + C_S}(1-p)x^+ \tag{11.2-42}$$

$$\frac{dx^-}{dt} = k_m^- \frac{C_S}{K_S + C_S}x^- + k_m^+ \frac{C_S}{K_S + C_S}px^+ \tag{11.2-43}$$

由此二式可得

$$\frac{dx^-}{dx^+} = \frac{k_m^- x^- + k_m^+ px^+}{(1-p)k_m^- x^+} \tag{11.2-44}$$

可解得两种细胞浓度之比 χ 为:

$$\chi = \frac{x^-}{x^+} = \frac{[(\alpha + p - 1)\chi_o + p](x^-/x_o^-)^{(\frac{\alpha}{1-p}-1)} - p}{\alpha + p - 1} \tag{11.2-45}$$

式中 x——代表开始培养时基团重组微生物浓度;

χ_o——代表种子中两种细胞的比例;

α——代表两种细胞最大比生长速率之比,即 $\alpha = k_m^-/k_m^+$。

离析了重组 DNA 质粒而不能生产特定产物的细胞在培养繁殖时,其物质消耗和能量消耗低于含重组 DNA 质粒的细胞,所以 $k_m^- > k_m^+$。如果此两种细胞的得率系数分别为 Y_{x^+/C_S}和 Y_{x^-/C_S}, $Y_{x^+/C_S} = \frac{\Delta x^+}{\Delta C_S}$而 $Y_{x^-/C_S} = \frac{\Delta x^-}{\Delta C_S}$,其中 ΔC_S 为生成细胞量(Δx^+ 或 Δx^-)时所消耗基质的量,则限制性基质的消耗速率如下:

$$-\frac{dC_S}{dt} = \frac{1}{Y_{x^+/C_S}}\frac{dx^+}{dt} + \frac{1}{Y_{x^-/C_S}}\frac{dx^-}{dt} \tag{11.2-46}$$

将(11.2-42)、(11.2-43)和(11.2-45)三式代入(11.2-46),并简略地认为 Y_{x^+/C_S}与 Y_{x^-/C_S}相等,则

$$-\frac{dC_S}{dt}=\frac{1}{Y_{x/C_S}}\frac{C_S}{K_S+C_S}\left\{k_m^+ + k_m^- \frac{[(\alpha+p-1)\chi_0+P](x^+/x_0^+)^{\frac{\alpha}{1-p}-p}-p}{\alpha+P-1}\right\}x^+$$

(11.2-47)

特定产物只能由含重组 DNA 质粒的细胞生产,产物 P 的生成速率为:

$$\frac{dP}{dt}=\alpha\frac{dx^+}{dt}+\beta x^+ \quad (\text{此外 } \alpha,\beta \text{ 为常数}) \qquad (11.2\text{-}48)$$

当 $x_0^+=10^{-4}\text{kg/m}^3$,$\chi_0$ 分别为 0、0.25、0.5 和 1 时,对微分方程组(11.2-42)、(11.2-43)、(11.2-47)和(11.2-48)求数值解,得出分批培养中两种细胞浓度比:限制性基质浓度和产物浓度的变化情况。参见图 11-5、图 11-6 和图 11-7。

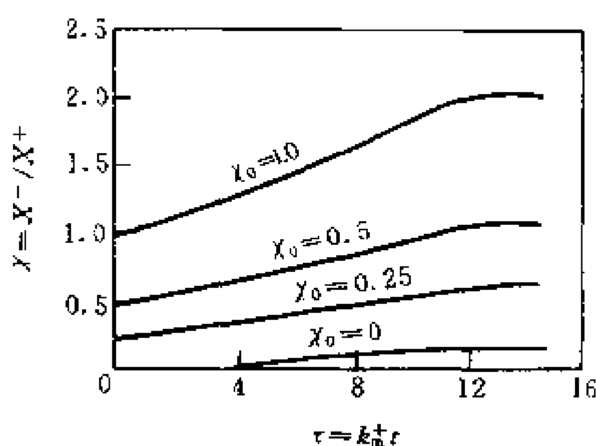


图 11-5 分批培养中宿主细胞与 DNA 重组细胞浓度比的变化

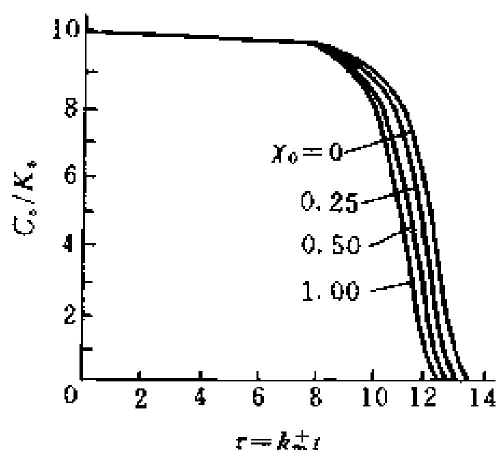


图 11-6 分批培养中限制性基质浓度的变化

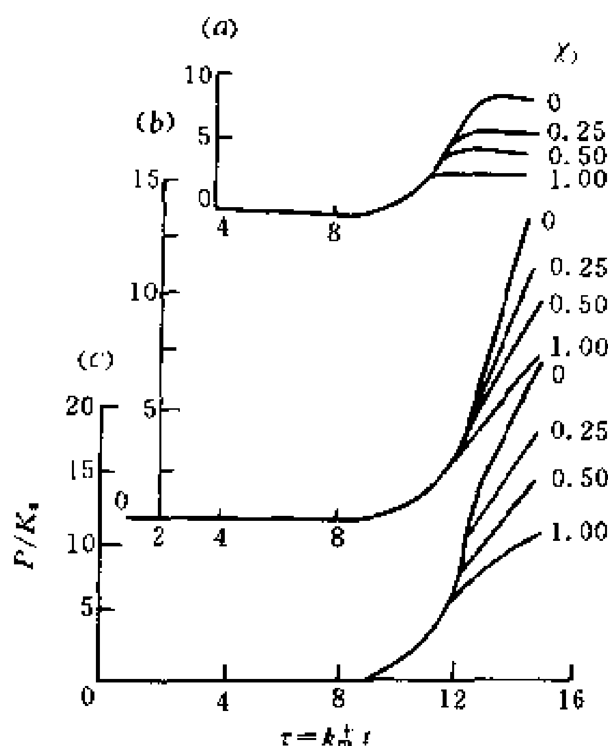


图 11-7 分批培养中产物浓度的变化
(a)产物生产与细胞生长相关；
(b)产物生产与细胞生长无关；
(c)产物生产与细胞生长部分有关。

11.2.5 分批培养中有关的动力学速率和参数

(一)得率系数

在细胞培养过程中伴随着复杂的生化反应，若设 ΔC 为生成细胞量 Δx 时所消耗基质的量，则可定义细胞对基质的得率系数为 $Y_{x/C}$

$$Y_{x/C}=\frac{\Delta x}{\Delta C} \tag{11.2-49}$$

若基质是氧分子，细胞对氧的得率系数可定义为：

$$Y_{x/O}=\frac{\Delta x}{\Delta O_2} \tag{11.2-50}$$

其倒数表示，每生成单位质量的细胞需要消耗氧的量。

如果在培养中细胞生产除了有二氧化碳与水之外的产物时，产物对基质的得率系数为

$$Y_{P/C}=\frac{\Delta P}{\Delta C} \qquad (11.2\text{-}51)$$

得率系数反映了生化反应中细胞和产物的收得率。细胞得率系数随微生物种类、基质种类、培养条件而变化。表 11-5 和表 11-6 分别列出了一些微生物的 $Y_{x/C}$、$Y_{x/D}$和一些产物的 $Y_{P/X}$值。可以推得 $Y_{P/x}/Y_{x/C}=Y_{P/C}$。

表 11-5　一些微生物细胞的得率系数

微生物	基　质	$Y_{x/c}$		$Y_{x/o}$	$1/Y_{x/o}$
		kg/kmol	kg/kg	kg/kmol	mol/kg
产朊假丝酵母	葡萄糖	91.8	1.28	42.2	24
	乙醇	31.2	1.30	19.5	51
	醋酸	21.0	0.90	22.4	45
产气克雷伯氏菌	葡萄糖	70.2	0.98		
	琥珀酸	27.1	0.57		
球形红假单胞菌	葡萄糖	81.0	1.12	46.7	21
啤酒酵母	葡萄糖	90.0	1.25	31.0	32
粪链球菌	葡萄糖	57.6	0.8		
	葡萄糖(厌氧)	21.6	0.3		
甲基单胞菌	甲醇	15.4	1.28	16.4	61
假单胞菌	甲醇	13.1	1.09	14.1	71
	甲烷	12.8	1.06	6.9	14.5

注:微生物培养过程是复杂的,影响因素很多,上述数据供参考。

表 11-6　一些微生物代谢产物的得率系数

产　　物	$Y_{P/x}$(kg/kg)
乙　　醇	0.47
柠 檬 酸	0.75
赖 氨 酸	0.32

(二)基质的消耗速率

在分批培养过程中细胞的生长和产物的生成使培养液中基质浓

度下降，根据物料衡算，可以得到如下的关系式：

$$-\frac{dc}{dt}=\frac{kx}{Y_{x/C}} \tag{11.2-52}$$

生长细胞、生成产物和维持细胞生命活动都需要能量，如果能源物质成为限制性基质，则物料衡算公式为：

$$-\frac{dc}{dt}=\frac{kx}{Y_G}+mx+\frac{q_P x}{Y_P} \tag{11.2-53}$$

式中 Y_G——代表细胞生长得率系数(kg/kmol 或 kg/kg)；

m——代表细胞的维持系数(kmol/kg·s 或 s^{-1})；

Y_P——代表产物的生成得率系数(kg/kg 或 kmol/kmol)；

q_p——代表产物的比生成速率。

前述的 $Y_{x/C}$和 $Y_{P/C}$是分别指细胞和产物对基质的总消耗得率系数，而 Y_G 和 Y_P 则分别表示用于细胞生长和用于产物生成的基质消耗得率系数。产物的比生成速率 q_p 可定义为：

$$q_P=\frac{1}{x}\frac{dP}{dt} \tag{11.2-54}$$

相当于单位质量细胞生产产物的速率。限制性基质的消耗速率也可用基质比消耗速率 q_s 表示：

$$q_S=-\frac{1}{x}\frac{dC_S}{dt} \tag{11.2-55}$$

于是(11.2-53)式变成

$$q_S=\frac{k}{Y_G}+m+\frac{q_P}{Y_P} \tag{11.2-56}$$

如果分批培养过程中除了细胞、二氧化碳和水外，没有其它的产物生成，则 $q_P=0$，由(11.2-55)、(11.2-56)和(11.2-52)三式可得

$$\frac{1}{Y_{x/C}}=\frac{1}{Y_G}+\frac{m}{k} \tag{11.2-57}$$

细胞对基质的得率系数 $Y_{x/C}$较易测定，而 Y_G 和 m 很难直接测定。若测定不同比生长速率 k 时的 $Y_{x/C}$，即可通过$\frac{1}{Y_{x/C}}$对 $1/k$ 作图，以图

解法分别在$\frac{1}{Y_{x/C}}$轴上截距和直线斜率求出 Y_G 和 m。

(三)产物生成速率

分批培养过程中产物的物料衡算有以下关系式:

$$\frac{dP}{dt} = q_P x - KP \qquad (11.2\text{-}58)$$

式中 P——代表产物浓度(kg/m^3 或 $kmol/m^3$);

K——代表产物分解速度常数(s^{-1})。

上式假定不稳定产物的分解为一级反应。如产物是稳定的,则上式 $K=0$。Gaden 将微生物发酵过程中产物的生成概括成三种情况:产物生成与细胞的生长相关、或部分相关、或不相关。

(1)产物的生成与细胞生长相关情况

相关情况指产物通常由细胞生长过程中将基质分解代谢所产生的(例如葡萄糖厌氧发酵生产乙醇),或是细胞正常代谢过程的中间产物(如氨基酸),而产物的生成速率可由下式表示:

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/C'} k x \qquad (11.2\text{-}59)$$

式中 $Y_{P/C'}$——代表单位质量细胞生成的产物量。

(2)产物的生成与细胞生长部分相关

此类产物的比生产速率方程中含一项与细胞的生长相关,然而还需有与细胞生长不相关项才能描述,这是对乳酸发酵过程中乳酸生成速率的变化情况归纳得到的。此产物的生成速率公式如下:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dx}{dt} + \beta x \qquad (11.2\text{-}60)$$

式中 α、β——代表比例常数。

将(11.2-60)式等号两边均除以细胞浓度 x,则得

$$\frac{1}{x}\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{1}{x}\frac{dx}{dt} + \beta \qquad (11.2\text{-}61)$$

即

$$q_p = \alpha k + \beta \qquad (11.2\text{-}62)$$

此式也适用于柠檬酸、酶等生产过程。Lee 等在对得到的基因重组微生物，对基因转录和转译所生成的不稳定基因编码的产物进行动力学研究中，发现产物的生产速率方程也类似于(11.2-62)式。

(3)产物生成与细胞生长不相关

此类情况的特点是细胞在生长阶段无产物积累，当细胞停止生长后却大量积累产物。这种类型的例子有抗生素、微生物毒素等次级代谢产物的生成。(11.2-58)式在原则上也可表示其产物生成速率。

户田清对产物生成的规律归纳成五种情况(可阅户田清，バイオテク，ロジ—のはなし，日刊工业新闻社，1983。)。

(四)分批培养动力学参数估计

分批培养时，细胞浓度、限制性基质浓度和产物浓度等是随培养时间不断变化的。综合分批培养中细胞、限制性基质和产物浓度变化的规律，所建立的动力学模型可由以下函数式构成的一组组微分方程来表达：

$$\frac{dX_i}{dt}=f_i(X_1、X_2、\cdots X_M;K_1、K_2、\cdots K_N) \qquad (11.2\text{-}63)$$

式中　X_i——代表状态变量($i=1,2,\cdots,M$)，如细胞浓度、限制性基质浓度、产物浓度等；

K_i——代表待确定的参数($i=1,2,\cdots,N$)；

t——代表培养时间。

待确定参数 K_i 可利用分批培养的实验数据进行估计。

根据各参数约束条件的可能取值范围，以及结束运算的判别标准 ε，首先给出各参数的估计值作为计算的初值，并代入(11.2-63)方程组，求出不同培养时间 X_i 的数值解，以 $\bar{X}_i(t)$ 表示，然后与其实验值 $X_i(t)$ 比较，以目标函数表示：

$$\delta=\sum_{i=1}^{M}\sum_{t=0}^{t_F}[X_i(t)-\bar{X}_i(t)]^2W_i \qquad (11.2\text{-}64)$$

式中　t_F——代表培养结束时间；

W_i——代表权重,依据各状态变量取不同值。

从而求出 δ,于是使参数估计转化为求 δ 成为最小时的 K_i 问题。采用最优化方法(参阅有关专著)求出各参数的新值,再代入(11.2-63)方程组,求数值解以及新 δ 值,如果新老 δ 之差的绝对值大于 ε,就将新的参数值又当作初值,重新按上述顺序求参数值。如此反复运算,直到新老参数得出的 δ 之差小于 ε 为止。求取参数值时可采用的优化方法有最速下降法、改进高斯-牛顿法、拟线性化法、单纯形法和最大原理控制变量法等(参阅有关专著)。

11.3 连续培养法

分批培养由于营养物质的耗尽或有害代谢物的积累,生化反应不能长时间进行而在一定的有限时间后停顿。倘若向生化反应器以一定流量不断地加入新培养基以补充细胞生长所需的消耗量,同时以相同流量不断地取出培养基,让有害代谢物不断地被稀释排出,生化反应便能长时期进行,这种培养方法称作连续培养。其方式有单级(单罐)连续培养和多级(多罐串连)连续培养。如果培养过程中在添加新培养液的同时排出旧培养液而使培养液组成恒定,那么培养过程就达到了稳定状态。

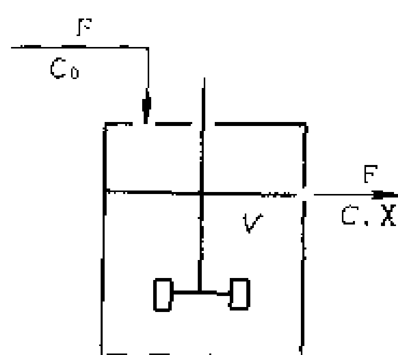


图 11-8 单级连续培养

11.3.1 单级连续培养

单级连续培养是连续培养中最简单的方式。假定在生化反应器中,新培养基的加入速率和旧培养液的抽出速率相等并保持恒定,生化反应器中能实现充分混合,使培养液各组分分布均匀,而培养液体积仍保持恒定。其细胞量衡算(参见图 11-8)为:

加入　生长　流出　积累

$$0 + kxV - Fx = V\frac{dx}{dt} \qquad (11.3\text{-}1)$$

式中　k——代表细胞的比生长速率；

X——代表反应器中的细胞浓度；

V——代表反应器中的培养液体积；

F——代表培养基添加流量或培养液流出的流量。

由于培养基加入反应器后立即被分散均匀，流出液的组成与反应器中各处培养液的组成相同。连续培养达到稳定状态时，$\frac{dx}{dt}=0$，(11.3-1)式则变为：

$$k = F/V = D \qquad (11.3\text{-}2)$$

式中　D——代表流量 F 与培养液体积 V 之比，称为稀释率。

此式表达了单级连续培养达到稳定状态时，细胞的比生长速率与稀释率相等的特性，说明在连续培养中可通过调控流量 F，使其改变稀释率，从而改变细胞的比生长速率。这一点在分批培养中是做不到的。

在连续培养中，限制性基质的物料衡算如下：

加入　流出　细胞生长消耗　积累

$$FC_{SO} - FC_S - \frac{kxV}{Y_{X/C_S}} = V\frac{dC_S}{dt} \qquad (11.3\text{-}3)$$

式中　C_{SO}——代表加料中限制性基质浓度；

C_S——代表反应器中限制性基质浓度；

Y_{X/C_S}——代表对限制性基质的细胞得率系数。

稳态时培养液中限制性基质浓度不变，$\frac{dC_S}{dt}=0$，即

$$D(C_{SO} - C_S) = \frac{kx}{Y_{X/C_S}} \qquad (11.3\text{-}4)$$

由于在稳态时 $D=k$，则上式可简化为：

$$Y_{X/C_S}(C_{SO}-C_S)=X \qquad (11.3\text{-}5)$$

在(11.2-17)Monod 方程适用情况下，稀释率与流出的培养液中限制性基质浓度的关系式为

$$D=k_m\frac{C_S}{K_S+C_S} \qquad (11.3\text{-}6)$$

由此式求得流出液限制性基质浓度随稀释率变化的关系式

$$C_S=\frac{DK_S}{k_m-D} \qquad (11.3\text{-}7)$$

代入(11.3-4)式，求出在稀释率为 D 时流出液中的细胞浓度为

$$x=Y_{X/C_S}\left(C_{SO}-\frac{DK_S}{k_m-D}\right) \qquad (11.3\text{-}8)$$

单级连续培养的操作中稀释率有一定的限制，当加料中限制性基质浓度为 C_{SO}时，细胞能达到临界比生长速率，它与 C_{SO}的关系是

$$k_c=K_m\frac{C_{SO}}{K_S+C_{SO}} \qquad (11.3\text{-}9)$$

所以单级连续培养的稀释率不可大于临界稀释率 $D_C(D_C=k_C)$，当 $D>D_C$ 时，由于细胞的比生长速率低于稀释率，细胞不断地从反应器中被洗走，最终培养液中细胞浓度被洗光而下降至趋于零，限制性基质浓度则升至 C_{SO}。图 11-9 描述在 $k_m=1.0h^{-1}$，$Y_{X/C_S}=0.5$，$C_{SO}=10kg/m^3$，$K_S=0.2kg/m^3$ 时，反应器中的细胞浓度和限制性基质浓度随稀释率变化的计算结果。

连续培养过程中，细胞的生产率 P_X 为流出液中细胞浓度与稀释率之乘积：

$$P_X=Dx \qquad (11.3\text{-}10)$$

将(11.3-8)式代入上式可得

$$P_X=DY_{X/C_S}\left(C_{SO}-\frac{DK_S}{k_m-D}\right) \qquad (11.3\text{-}11)$$

由图 11-9 可知，P_X 有一极大值，当细胞的生产率 P_X 处于最大时，相应的稀释率 D_C 为

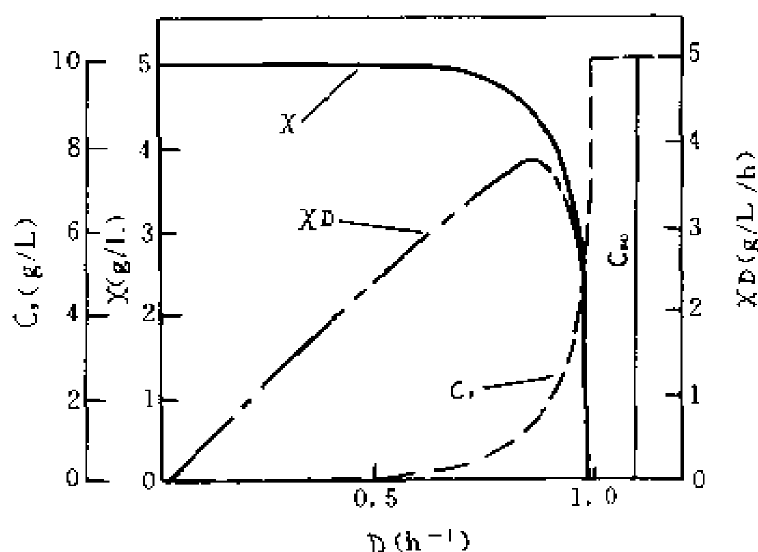


图 11-9 单级连续培养中 X、C_S 与 D 的关系

$$D_C = k_m\left(1-\sqrt{\frac{K_S}{K_S+C_{SO}}}\right) \qquad (11.3\text{-}12)$$

此时反应器中相应的细胞浓度 x_C 为

$$x_C = Y_{X/C_S}(C_{SO}+K_S-\sqrt{K_SC_{SO}+K_s^2}) \qquad (11.3\text{-}13)$$

于是细胞的最大生产率为

$$P_{xm} = Y_{X/C_S}k_mC_{SO}\left(\sqrt{\frac{K_S+C_{SO}}{C_{SO}}}-\sqrt{\frac{K_S}{C_{SO}}}\right)^2 \qquad (11.3\text{-}14)$$

若 $C_{SO} \gg K_S$，则

$$P_{xm} = Y_{X/C_S}k_mC_{SO} \qquad (11.3\text{-}15)$$

现将连续培养与分批培养的细胞生产率进行比较。假定在分批培养使用相同的起始培养基，接种后的细胞浓度为 x_o，最终得到的细胞最大浓度为 x_F，并设在 X_F 时 $C_{SO}=0$，而细胞仍处于指数生长阶段，一个实现分批培养过程的生产周期所需时间 t_B 应是

$$t_B = t_L + \frac{1}{k_m}\ln\frac{X_F}{X_o} + t_R + t_P \qquad (11.3\text{-}16)$$

式中　t_L——代表延迟期化费的时间；

t_R——代表放出培养液占用的时间；

t_P——代表洗反应器、加入新培养基、灭菌等操作所化去的时间。

如此估算分批培养的细胞生产率为

$$P_{XB}=\frac{x_F-x_o}{t_B}=\frac{Y_{X/C_S}C_{SO}}{\frac{1}{k_m}\ln\frac{x_F}{x_o}+t_L+t_R+t_P} \qquad (11.3\text{-}17)$$

对比(11.3-15)与(11.3-17)两式得

$$\frac{P_{xm}}{P_{XB}}=\ln\frac{x_F}{x_0}+k_m(t_L+t_R+t_P) \qquad (11.3\text{-}18)$$

由此可知，连续培养时细胞的生产率高于分批培养的。

若限制性基质是能源，那么一部分要用于细胞维持生产所需要，如再考虑细胞生成代谢产物的需要，则(11.3-3)式要写成

$$FC_{SO}-FC_S-\frac{kxV}{Y_G}-mxV-\frac{q_PxV}{Y_P}=V\frac{dC_S}{dt} \qquad (11.3\text{-}19)$$

当产物的生成可忽略时，根据稳定状态 x、C_S、F(或 D)三者关系，可求得不同稀释率下的 Y_{X/C_S}，由(11.2-57)式求出维持系数 m 和细胞的生长得率系数 Y_G。

11.3.2 细胞回流的单级连续培养

图 11-10 描述了进行细胞回流的单级连续培养过程。该技术即是将单级连续培养流出液中的细胞回收浓缩，送回生化反应器中。这相当于不断对生化反应器进行接种。

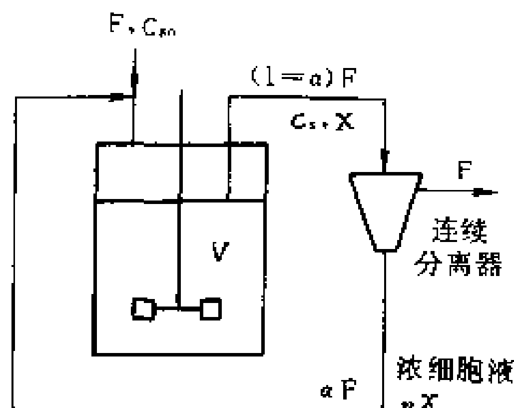


图 11-10 细胞回流的单级连续培养
α 回流比；n 浓缩倍数

关于生化反应器中细胞物料的衡算为

$$\overset{\text{回流}}{\alpha Fnx} - \overset{\text{流出}}{(1+\alpha)Fx} + \overset{\text{生长}}{kxV} = \overset{\text{积累}}{V\frac{dx}{dt}} \tag{11.3-20}$$

式中 α——代表回流比；

n——代表分离器中细胞的浓度倍数。

当反应器中培养液处于稳定状态时，$\frac{dx}{dt}=0$，于是

$$kc = D(1+\alpha-n\alpha) \tag{11.3-21}$$

因此，在稳态下进行细胞回流连续培养时，生化反应器中的细胞比生长速率与稀释率是不相等的。若由于细胞浓缩倍数 $n>1$，使 $1+\alpha-n\alpha$ 恒小于 1，则稀释率会恒大于比生长速率。

对于限制性基质的物料衡算：

$$\overset{\text{加入}}{FC_{SO}} + \overset{\text{回流}}{\alpha FC_S} - \overset{\text{流出}}{(1+\alpha)FC_S} - \overset{\text{生长消耗}}{\frac{kxV}{Y_{X/C_S}}} = \overset{\text{积累}}{V\frac{dC_S}{dt}} \tag{11.3-22}$$

在稳定状态下，$\frac{dC_S}{dt}=0$，上式则变为

$$x = \frac{D}{k}Y_{X/C_S}(C_{SO}-C_S) \tag{11.3-23}$$

将(11.3-21)式代入可得

$$x = Y_{X/C_S}(C_{SO}-C_S)/(1+\alpha-n\alpha) \tag{11.3-24}$$

此式表明，回流操作时反应器中细胞浓度为无回流时的 $1/(1+\alpha-n\alpha)$倍。为了简便而令$(1+\alpha-n\alpha)=W$，则

$$k = D(1+\alpha-n\alpha) = WD \tag{11.3-25}$$

代入 Monod 方程，整理成

$$C_S = \frac{K_S WD}{k_m - WD} \tag{11.3-26}$$

于是

$$x=\frac{Y_{X/C_S}}{W}\left(C_{SO}-\frac{K_SWD}{k_m-WD}\right) \qquad (11.3\text{-}27)$$

又将临界状况的(11.3-25)式，即 $k_c=WD_c$ 代入(11.3-9)式而得

$$D_C=\frac{1}{W}\frac{k_mC_{SO}}{K_S+C_{SO}} \qquad (11.3\text{-}28)$$

上式和(11.3-27)式分别描述了回流比越大，W 就越小，D_C 和 x 便会增大，所以细胞回流有利于提高细胞生产率，图 11-11 表明，细胞回流的连续培养，细胞生产率比无回流时(虚线所示)大大提高。由于 D_C 增大，显然加料流量可以增大。如果加料流量不变，则可缩小反应器体积。细胞回流连续培养技术已被广泛地应用于废水的生化处理过程。

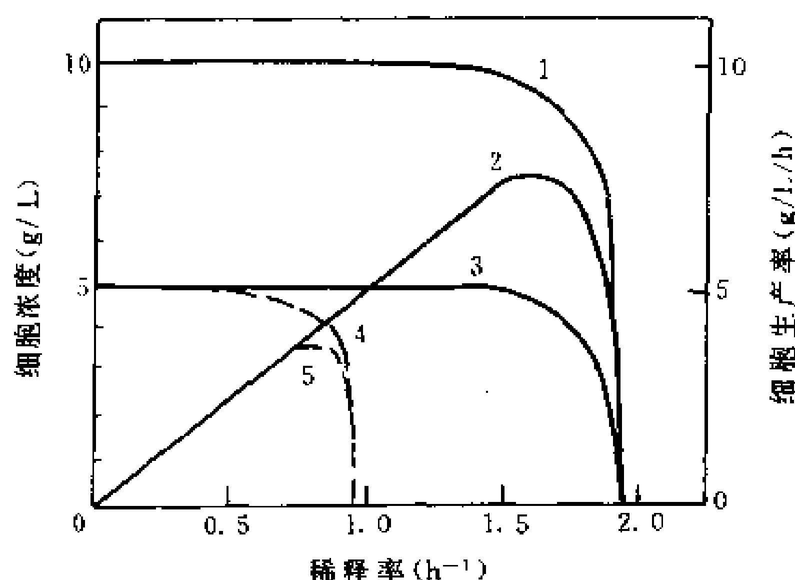


图 11-11 细胞回流(1,2,3)与不回流(4,5)的比较
(1,4)反应器中细胞浓度；(2,5)细胞生产率；(3)出口细胞浓度。($k_m=1.0h^{-1}$, $Y_{X/C_S}=0.5$, $K_S=0.2g/L$, $C_{SO}=10 g/L$, $\alpha=0.5$, $n=0.2$)

11.3.3 多级连续培养

几个生化反应器串联就成为多级连续培养，其特点是第一个反应器的流出液作为第二个反应器的加料液，第二个反应器流出液又

成为第三个反应器的加料液等等，进行多级连续培养时，在第二反应器以后的各级可同时添加新培养基，还可有更复杂的操作过程。现简便地以二级连续培养为例进行分析，并假定一、二级反应器内培养液体积相同，第二个反应器无新培养基加入，参见图 11-12。

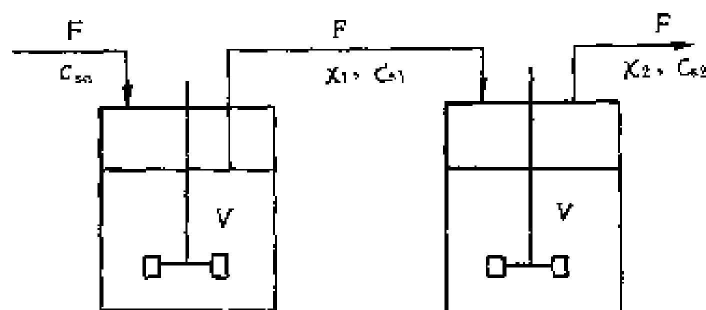


图 11-12　二级连续培养示意

二级连续培养的第一个反应器情况与单级连续培养相同，而第二级的细胞物料衡算是

$$Fx_1 - Fx_2 + k_2x_2V = V\frac{dx_2}{dt} \tag{11.3-29}$$

式中　X_1、X_2——分别代表第一级和第二级反应器内的细胞浓度；

k_2——代表第二级反应器中细胞的比生长速率。

有关限制性基质的物料衡算

$$FC_{S1} - FC_{S2} - \frac{k_2x_2V}{Y_{X/C_S}} = V\frac{dC_S}{dt} \tag{11.3-30}$$

反应器内处于稳定状态时，$dx_2/dt = 0$，$\frac{dC_S}{dt} = 0$，则(11.3-29)和(11.3-30)两式分别变为

$$k_2 = D\left(1 - \frac{x_1}{x_2}\right) \tag{11.3-31}$$

$$x_2 = \frac{D}{k_2}Y_{X/C_S}(C_{S1} - C_{S2}) \tag{11.3-32}$$

由于 $0 < x_1/x_2 < 1$，所以在串联的第二级反应器中细胞比生长速率小于稀释率，这是因为从第一反应器中流出的培养液中限制性基质浓

度一般较低，于是第二反应器中细胞的生长较少。

将(11.3-8)和(11.3-7)两式分别作为 x_1、C_{S1}以及(11.3-31)式代入(11.3-32)式，整理后可得

$$x_2 = Y_{X/C_S}(C_{S0} - C_{S2}) \tag{11.3-33}$$

又根据 Monod 方程，第二级中细胞比生长速率可写成

$$k_2 = k_m \frac{C_{S2}}{K_S + C_{S2}} \tag{11.3-34}$$

再将(11.3-31)和(11.3-33)两式以及(11.3-8)式作为 x_1 代入上式后整理得

$$(k_m - D)C_{S2}^2 - \left(k_m C_{S0} - \frac{K_S D^2}{k_m - D} + K_S D\right)C_{S2} + \frac{K_S^2 D^2}{k_m - D} = 0 \tag{11.3-35}$$

解上述二次方程，可求出不同稀释率下第二级反应器处于稳态时具有的 C_{S2}。然后由(11.3-33)式算出 X_2。

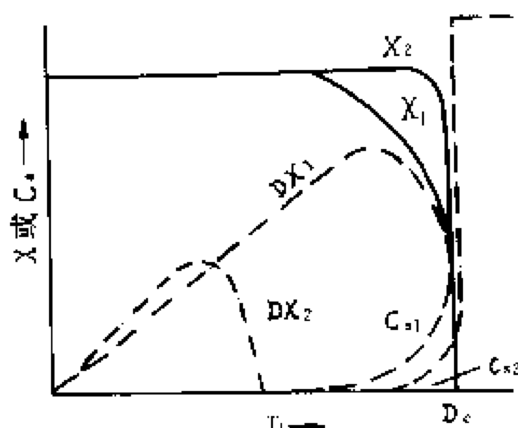


图 11-13　二级连续培养时各级细胞浓度、限制性基质浓度及细胞生产率与稀释率的关系

图 11-13 描述了二级连续培养时，各级反应器内的细胞浓度，限制性基质浓度和细胞生产率随稀释率变化的计算结果。由此可见，二级生化反应器在同样的临界稀释率 D_C 下均能被洗光。当稀释率 $< D_C$ 时，x_2 恒大于 X_1，而 C_{S2} 比 C_{S1} 低得多，这说明在二级连续培养过程中基质的利用较完全，然而在第二级生化反应器中，细胞的生长率($P = Dx$)却小得多。

11.3.4　连续培养生物技术的应用

在工业上连续培养的应用由于技术较复杂而远不如分批培养普遍。不过，连续培养时细胞的生长速率比分批培养高，所以已在单细

胞蛋白的生产、丙酮-丁醇和啤酒等生产中得到应用。在废水的生化处理中以活性污泥循环利用的操作技术也得到应用。连续培养也存在一些问题，主要的是连续培养的延续时间长，污染杂菌的机会较多，细胞变异退化现象等均较分批培养突出。由于退化的细胞比例逐渐增大而引起生产能力下降。

根据连续培养的特点，在稳定状态时，反应器内细胞、基质和产物浓度恒定不变，在单级连续培养中细胞的比生长速率还和稀释率相同，改变加料流量即可改变细胞的比生长速率，这对于研究细胞代谢活动与环境的关系，研究细胞在不同比生产速率下的生理特性和生化反应动力学等都是有利的。

连续培养的生物技术还可用于富集或筛选微生物的研究，也被用于微生物细胞中基因重组 DNA 质粒稳定性及其影响因素和质粒的结构性不稳定等的研究。

通过连续培养的动力学研究，发现争夺利用限制性基质的几种细胞在混合培养时，比生长速率小的细胞在连续培养过程中会被洗掉，而由比生长速率大的细胞所取代。若选用适当的营养物质作为限制性基质，有可能提高产物的生产率。例如限制性基质对变异链球菌生产乳酸的影响，当用磷酸盐或氮源作为培养基中限制性基质时，菌体的生长会受到限制，而培养基中碳源转化成乳酸的效率却提高了。又如用多级连续培养红曲霉生产β-半乳糖苷酶时，在葡萄糖-半乳糖培养基中，酶的生产会受半乳糖诱导，而葡萄糖却对半乳糖的利用发生竞争性抑制作用。如果因势利导，采用第一级以葡萄糖作碳源，以获得大量菌体并回流部分菌体，在第二级中加入半乳糖而促进酶的生产，可使β-半乳糖苷糖的生产率较大地提高。

11.4 其它培养方法

11.4.1 补料分批培养

补料分批培养技术是在分批培养过程中添加营养物质，经过一

段时间后取出培养液的培养方法。由于补料,培养液体积逐渐增大,到一定时间间隔取出部分培养液,剩下的培养液继续进行补料培养,反复多次补料和放料操作,这是一种介于分批培养和连续培养的方法,称作重复补料分批培养。

补料分批培养可在一定程度上控制培养液中的基质浓度,提高产物的生产效率,它可应用于如下的几种情况中:

(一)细胞的高密度培养

通过流加高浓度的营养物质,培养液中细胞浓度可达到非常高的程度,如大肠杆菌的菌体浓度可达 125kg(干重)/m^3,这对于胞内产物的生产过程十分有利。

(二)基质会发生抑制细胞的培养过程

例如一些微生物能利用甲醇、乙醇、醋酸或某些芳香族化合物作基质,但这些物质在较高浓度下对细胞的生长会有抑制作用,则采用补料培养法,使这些物质浓度保持在较低水平,消解它们的抑制作用,又满足该细胞对基质的需要。

(三)某些酶合成受阻遏过程

例如,某些易被微生物利用作碳源的物质(如葡萄糖)会使细胞某些酶的合成受到阻遏,采用补料培养使培养液中葡萄糖浓度保持在低水平,从而避免葡萄糖的阻遏。

总之培养基中有抑制或阻遏作用的物质,但又是不能缺少的,都可以采取补料培养技术加以解决。补料分批培养的补料操作可间歇地进行,也可连续流加进行,其流加物料的流量可恒定,也可随情况而变化。

连续流加补料时,反应器中的细胞、产物会被稀释,于是对全部培养液进行如下的物料衡算:

细胞:
$$\frac{d(Vx)}{dt}=kVx \tag{11.4-1}$$

基质:
$$\frac{d(VC_S)}{dt}=FC_{SO}-\frac{1}{Y_{X/C_S}}\frac{d(Vx)}{dt} \tag{11.4-2}$$

产物：
$$\frac{d(VP)}{dt} = q_P Vx \tag{11.4-3}$$

体积：
$$\frac{dV}{dt} = F \tag{11.4-4}$$

由于细胞浓度和培养液体积都随着时间变化，所以对细胞而言，则是

$$\frac{d(Vx)}{dt} = V\frac{dx}{dt} + x\frac{dv}{dt} \tag{11.4-5}$$

由(11.4-1)、(11.4-4)和(11.4-5)三式合并可得

$$\frac{dx}{dt} = (k - F/V)x = (k - D)X \tag{11.4-6}$$

对于限制性基质，由(11.4-1)、(11.4-2)和(11.4-4)三式可得另一衡算式：

$$\frac{dC_S}{dt} = \frac{F}{V}(C_{SO} - C_S) - \frac{kx}{Y_{X/C_S}} \tag{11.4-7}$$

式(11.4-6)和(11.4-7)分别描述了流加分批培养时，细胞浓度和限制性基质浓度的变化规律。当流加速率 F 保持恒定，而加入料液中限制性基质浓度比反应器中限制性基质的初始浓度高时，随着料液的流加，反应器中细胞浓度逐渐增大，限制性基质浓度开始时也增大，到了一定时间后被细胞所消耗的增多而逐渐下降，最后限制性基质浓度趋于0，细胞浓度趋向定值。$\frac{dC_S}{dt}=0$，$\frac{dx}{dt}=0$，反应器内趋于稳态，根据(11.4-6)式得知，在这种拟稳态条件下细胞的比生长速率与稀释率可认为相同。由于不断进行补料，培养液体积不断地增大，则稀释率逐渐减少，进入拟稳态后，虽然细胞浓度趋向一定值，培养液中细胞的总量却随时间而线性地增加。

如果培养液中限制性基质浓度能够维持恒定，则细胞的比生长速率便可保持恒定，反应器中的细胞总量随时间指数增加，此时补料须与时间以指数关系流加，而不能恒速进行：

$$F(t) = \frac{kV_o x_o}{Y_{X/C_S}(C_{SO} - C_S)}\exp(kt) \tag{11.4-8}$$

式中　V_o——代表培养液的初始体积；

x_o——代表开始补料时反应器内的细胞浓度。

当以能源为限制性基质时，并有产物生成，部分能源要用于细胞维持生命活动，则式(11.4-2)应为

$$\frac{d(VC_S)}{dt}=FC_{S0}-\frac{kxV}{Y_G}-mxV-\frac{q_pxV}{Y_p} \tag{11.4-9}$$

由(11.4-3)和(11.4-4)式，可得产物浓度的变化率为：

$$\frac{dp}{dt}=q_px-PD \tag{11.4-10}$$

补料开始后经 t 时间的产物浓度是：

$$P=\frac{P_oV_o}{V}+\frac{1}{V}\int_0^t q_p dt \tag{11.4-11}$$

式中　P_o——代表开始补料时产物的浓度。

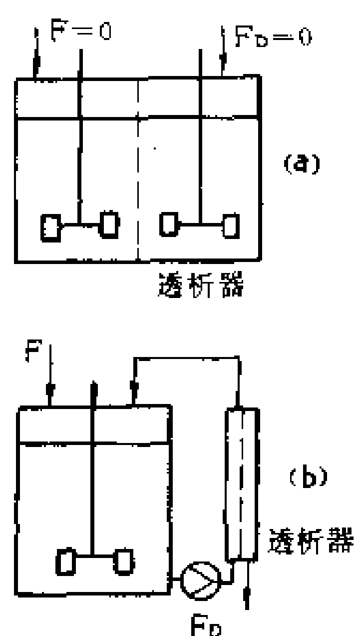


图 11-14　透析培养的一般形式

(a)$F=0$，$F_D=0$ 称分批培养-分批透析；(b)$F>0$、$F_D>0$ 称连续培养-连续透析

补料分批培养在工业上应用已取得极好的效果。例如，以葡萄糖代乳糖作碳源的青霉素发酵生产技术中，葡萄糖浓度稍有偏高就会造成菌体生长阶段生化反应器中供氧速率不足而培养液 pH 下降，致使在青霉素生产阶段青霉素的生产大大地减少。采用补料方法，令葡萄糖浓度维持在最合适的水平上，即可提高青霉素的产量。还有在青霉素发酵生产中需加前体苯乙酸，但苯乙酸高于一定浓度后，便具有对青霉菌生长产生抑制作用的毒性，然而采用补料操作，使苯乙酸维持在低浓度，既可满足青霉素合成的需要，又可大大地减轻苯乙酸的抑制作用。

补料分批培养技术在生产头孢菌素 c 时流加葡萄糖、蛋氨酸和硫酸铵，可提高

头孢菌素的产量。此外，在培养大肠杆菌或生产胞内产品的基因重组微生物等方面的应用也取得较好的效果。

11.4.2 透析培养

各种代谢产物随着培养过程中细胞的生长，往往会积累起来，这些代谢产物中有的可能有诱导作用，有的具有抑制作用或毒性而使细胞的生产和特定产物的生产受到抑制。试图利用透析膜让一些有害产物通过透析排走，于是各种设计的透析培养装置和技术被开拓出来，通称透析培养或过滤培养。在透析培养技术中，一般形式可参见图 11-14。其主要作用是将细胞阻留在反应器中。更复杂的透析培养设计可见专著。

当生化反应器中补料流量 $F=0$，透析器的加料速率 $F_D=0$ 时为分批培养-分批透析；$F>0, F_D>0$ 为连续培养-连续透析；$F>0$ 而 $F_D=0$ 为连续培养-分批透析；$F=0, F_D>0$ 为分批培养-连续透析。

产物通过透析膜的透析速率 r 与膜的产物透析系数 P_{mp}、膜面积 A 以及膜两侧的浓度差 ΔP 有关，即

$$r = P_{mp} A \Delta P \qquad (11.4\text{-}12)$$

透析装置中限制性基质与产物的物料衡算为

$$V_D \frac{dC_{SD}}{dt} = F_D C_{SDF} - F_D C_{SD} + P_{ms}/A(C_S - C_{SD}) \qquad (11.4\text{-}13)$$

$$V_D \frac{dP_D}{dt} = F_D P_{DF} - F_D P_D + P_{mp} A(P - P_D) \qquad (11.4\text{-}14)$$

式中 V_D——代表透析装置中液体体积；

F_D——代表透析装置的加料速率；

C_{SD}——代表透析装置中的限制性基质浓度；

C_S——代表反应器中的限制性基质浓度；

P_D——代表透析装置中产物浓度；

P——代表反应器中产物浓度；

C_{SDF}——代表透析器加料中限制性基质浓度；

P_{DF}——代表透析器加料中产物浓度；

P_{ms}——代表限制性基质的透析系数；

P_{mp}——代表产物的透析系数。

反应器中的物料衡算为

$$基质:V\frac{dC_S}{dt}=F(C_{SF}-C_S)-P_{ms}A(C_S-C_{SD})-\frac{kxV}{Y_{X/C_S}} \quad (11.4\text{-}15)$$

$$细胞:V\frac{dx}{dt}=Fx_F+kxV \quad (11.4\text{-}16)$$

$$产物:V\frac{dp}{dt}=F(P_F-P)-P_{mp}A(P-P_D)+q_pxV \quad (11.4\text{-}17)$$

式中　x_F、C_{SF}、P_F——分别代表反应器加料中细胞、限制性基质和产物浓度；

对于连续培养-连续透析过程，在生化反应器与透析器中均可达到稳定状态，以上各公式等号左边的对时间导数项为零，由此得到细胞浓度 x、细胞生产率 Dx、细胞生产效率$(Dx)_{实际}/(Dx)_{理想}$与稀释率 D 的关系，可以发现在低稀释率情况下，透析培养能获得比非透析培养高得多的细胞浓度，透析培养的细胞生产率 Dx 也高于非透析的连续培养，但基质转化为细胞生长的效率却下降了。

透析培养对消除产物的抑制作用是相当有效的，例如在乙醇或乳酸的发酵生产中采用透析培养方法，可获得很好的效果，Taniguchi 等设计的透析培养装置和操作技术，对培养乳脂链球菌生产乳酸过程中，消除乳酸的抑制该菌作用取得良好效益。菌体浓度可达 81.5kg(干重)/m^3，细胞生产率为分批培养的 19 倍，乳酸生产率比分批培养大 9 倍〔M. Taniguchi etc., J. Ferm. Tech., 65, 179～184(1987)〕。

此外，W. R. Tolbert 等曾用灌流培养法培养过 Walker 256 鼠肿瘤细胞〔W. R. Tolbert etc., In Vitro, 17, 885～890(1981)〕；M. Minier 等和 M. Taya 等分别采用了萃取培养〔M. Minier etc., Biotech. Bioeng., 24, 1565～1579, (1982)〕和〔M. Taya etc., J. Ferm. Tech., 63, 181～187(1985)〕；G. R. Cysewski 等利用了闪蒸培养〔G.

R. Cysewski etc., Biotech. Bioeng., 19, 1125～1143(1977)]; S. K. Tangnu 等利用离子交换透析培养法生产水杨酸[S. K. Tangnu etc., Proc. Biochem., 16(5), 24～27(1981)], 都是为了提高细胞生产率或产物的产量。

11.5 细胞培养中氧气的供应

11.5.1 细胞的呼吸

除了专性厌氧微生物视氧分子为有害物质只能从含氧化合物中得到氧组分外，许多细胞必须摄取分子状态氧才能生长，这些细胞依靠体内的糖、脂肪等有机化合物的生物氧化获得生命活动所需的能量，氧是生物氧化中电子传递过程末端的电子受体，通过生物氧化可产生大量能量，部分能量以生成 ATP(高能磷酸键)等形式贮存以供生物代谢之用，例如 1 分子葡萄糖经氧化磷酸化途径完全氧化后共生成 38 分子 ATP；部分能量以热的形式释放或维持体温或耗散掉。

生物氧化也称作细胞呼吸，细胞利用氧的速率常用比耗氧速率(或称呼吸强度)Q_{O_2}来表示，其单位为 mol O_2/kg × s，即单位质量的细胞(干重)在单位时间内所消耗氧的量(一般以摩尔计算)；也有用单位体积培养液在单位时间内消耗氧的速率 r(mol O_2/m^3 × s)表示，并将此称为摄氧率。它们有以下关系：

$$r = Q_{O_2} x \tag{11.5-1}$$

式中　x——代表培养液中细胞的浓度(干重)。

影响细胞耗氧速率的因素很多，有营养物质的种类和浓度、培养温度、pH、代谢物的浓度等。这些因素都涉及培养液中的溶解氧浓度。一般在 25℃ 和 1.01×10^5Pa 时，空气中的氧在纯水中的平衡浓度仅约 7.7g/m^3(见表 11-7)，在培养液中由于基质的作用，氧分子的平衡浓度通常会变得较低，远小于 7.7g/m^3 以下(不过在一些物料中氧的平衡浓度却大得多，例如在 16℃ 乙醇中为 1.91mol/m^3，15℃ 在甲乙酮中为 2.32mol/m^3，16℃ 在豆油中为 1.04mol/m^3 和在正己烷中

为 2.81mol/m³)。如果细胞呼吸较旺,且浓度较高时,培养液中溶解氧会在极短时间内耗尽,所以为保证细胞培养和代谢反应正常进行,必须在生化反应器中不断通入无菌空气进行供氧,因此供氧能力也是一个重要因素。

A. W. Hixson(Ind. Eng. Chem.,42,1792～1801(1950)等发现,细胞的呼吸强度与培养液中的溶解氧浓度有关,当培养液中溶解氧浓度低于某临界浓度时,酵母细胞呼吸强度会随着溶解氧浓度减少而下降。只要溶解氧浓度高于临界值 C_{cr},细胞的呼吸就不会受到抑制。表 11-8 列出了某些细胞的氧浓度临界值 C_{cr},它们一般在 0.003～0.05mol/m³ 间,大概是空气中氧在培养液中平衡浓度的 1%～20%。

表 11-7　纯水中的饱和氧浓度*

温度 ℃	浓度 mol/m³	温度 ℃	浓度 mol/m³	温度 ℃	浓度 mol/m³	温度 ℃	浓度 mol/m³
0	0.457	13	0.316	26	0.234	39	0.185
1	0.443	14	0.308	27	0.229	40	0.181
2	0.429	15	0.301	28	0.224		
3	0.417	16	0.294	29	0.220		
4	0.404	17	0.287	30	0.215		
5	0.393	18	0.280	31	0.210		
6	0.382	19	0.273	32	0.207		
7	0.371	20	0.267	33	0.204		
8	0.360	21	0.261	34	0.200		
9	0.351	22	0.255	35	0.197		
10	0.342	23	0.248	36	0.194		
11	0.333	24	0.245	37	0.191		
12	0.322	25	0.240	38	0.188		

* 处于 1.01×10^5Pa、含氧 20.9% 与水蒸气饱和的大气情况下的数据

表 11-8　一些细胞的氧临界浓度 C_{cr}

细胞种类	温度 ℃	C_{cr} mol/m³	细胞种类	温度 ℃	C_{cr} mol/m³
发光细菌	24	0.01	酵母	34.8	0.0046
维涅兰德固氮菌	30	0.018～0.049		20	0.0037
大肠杆菌	37.8	0.0082	产黄青霉菌	24	0.022
	15	0.0031		30	0.009
粘质沙雷氏菌	31	0.015	米曲霉	30	0.020
脱氮假单胞菌	30	0.009	肾脏片	37	0.85

(一)碳源种类对细胞耗氧速率的影响

一般情况,细胞对葡萄糖的利用比其它碳水化合物容易,因而在含葡萄糖的培养基中,细胞易进行生物氧化而耗氧速率较大。例如青霉菌分别在含葡萄糖、蔗糖和乳糖的培养基中摄氧率为 13.4、6.7 和 4.9mol/m³。Moo-Young 发现以糖类作碳源时,每消耗 1 分子碳约需 0.4 分子氧,而以烃为碳源时则需要 1 分子氧。以上说明碳源种类对细胞需氧量和耗氧影响很大。

(二)基质浓度对细胞耗氧速率的影响

培养基中基质浓度对细胞的耗氧速率有很大的影响。例如,在链霉素发酵中的原培养基营养物质浓度的情况下,70h 的摄氧率为 34mol $O_2/m^3 \times h$,补料后第 78h 时摄氧率升至 40.9mol $O_2/m^3 \times h$,随着营养物质的消耗,在 94h 时又降到 20mol $O_2/m^3 \times h$。

(三)培养时间对细胞耗氧速率的影响

通过研究发现,在分批培养中,疣孢漆斑霉(Myrothecium verrucaria)处于指数生长期的前期时,细胞呼吸强度达到最大,随后逐渐下降,而因细胞浓度仍在不断增大,培养液的摄氧率仍在增大,在指数生长期的后期达到最大。

生产细胞代谢产物的最佳需氧量不一定是细胞生长的最佳需氧量。在利用黑曲霉由单宁生产没食子酸时,过量通氧有利于菌体生长,但不利于没食子酸的生产。在利用黄色短杆菌生产各种氨基酸

时，提高溶解氧的浓度，有利于谷氨酸、脯氨酸、精氨酸、谷胱甘肽、天冬氨酸、赖氨酸、苏氨酸和异亮氨酸，但不利于亮氨酸、缬氨酸和苯丙氨酸的生产（它们生产的最佳溶解氧浓度分别为临界氧浓度的85%、60%和55%）。因为苯丙氨酸、缬氨酸和亮氨酸是由酵解途径合成的，增加溶解氧浓度有利于通过三羧酸循环生成谷氨酸和天冬氨酸类氨基酸的生产，却降低了经酵解途径合成氨基酸类的生产。又如头孢霉素和卷须霉素产生菌的临界氧浓度分别是溶解氧浓度的约7%和23%而不影响两种抗生素生产的最低氧浓度分别是溶解氧浓度的10%和8%。由此可知，在头孢霉素生产中应让溶解氧浓度高于临界氧浓度，而卷须霉素的生产时溶解氧浓度的供应可低于临界氧浓度〔C. J. Feren etc. ,Biotech. Bioeng. ,11,583～592(1969)〕。

11.5.2 氧分子的供给

需氧细胞培养过程大多数都是在培养液中通入无菌空气进行供氧，而细胞在培养液中利用的是溶解的氧。于是氧从空气泡输送到细胞内要经历一系列传递过程，则需克服一系列传递阻力。其内容有：

(1)氧从气泡中气相主体扩散到气-液界面，需要克服阻力 R_1；

(2)氧穿过气-液界面需要克服阻力 R_2；

(3)氧透过气-液界面液膜侧滞流区到达液相主体也要克服阻力 R_3；

(4)液相主体中向细胞外侧扩散传递氧也要克服阻力 R_4；

(5)氧透过细胞(或细胞团)外的液膜滞流区，到达细胞(或细胞团)与液体间界面所克服的阻力 R_5；

(6)氧向细胞团内细胞间介质中扩散需克服的阻力 R_6；

(7)穿过液体与细胞(团)之间界面所克服的阻力 R_7；

(8)进入细胞内需克服的阻力 R_8。

当气液界面不存在表面活性物质时，气-液界面阻力 R_2 可忽略不计。在细胞以单个游离状态悬浮于培养液中的情况时，上述第六项就不存在。如果细胞被吸附在气泡表面时，氧分子穿过气-液界面

后，就有可能直接透过液体与细胞间界面并进入细胞，氧传递的阻力少得多了。

氧分子的传递过程总驱动力是其气相中分压与细胞内氧浓度所呈现的平衡分压之差。总驱动力为氧进行传递而消耗于以上各串联的传递阻力。当氧的传递达稳态时，单位截面积上氧的传递率 r_{O_2} 在串联的各步中相等，即

$$r_{O_2} = \text{传递系数} \times \text{驱动力} = K_1 \Delta p_1 = K_2 \Delta p_2 = \cdots k_i \Delta p_i \tag{11.5-2}$$

式中 Δp_i——代表氧传递各步的驱动力；

K_i——代表氧传递各步的传递系数，它相当于各步阻力的倒数$(\frac{1}{R_1}、\frac{1}{R_2}\cdots\frac{1}{R_i})$。

根据亨利定律，在一定温度的平衡状态下，气体在液体里的溶解度和该气体的平衡分压成正比。于是

$$p_{o_2} = k_{HC} C_{o_2} \tag{11.5-3}$$

式中 k_{HC}——代表溶液中以 mol/m^3 表示浓度的亨利常数，其数值由温度、压力与溶质和溶剂性质所决定；

P_{o_2}——代表平衡状态下空气中氧气的分压。

由此可知，增加氧气分压可增加氧气在培养液中的浓度，提高氧分子传递的驱动力。从表 11-7 数据表明，温度增加直接影响到亨利常数 k_{HC} 值，从而使氧溶解度减少。

在电解质溶液中，由于盐析作用，氧的溶解度会降低，电解质溶液中氧的溶解度与电解质浓度的关系可由 Sechenov 公式表示：

$$\log \frac{C_w}{C_e} = KC_B \tag{11.5-4}$$

式中 C_w、C_e——分别代表在同温同压下氧于水中和电解质溶液中的溶解度；

C_B——代表电解质浓度($kmol/m^3$)；

K——代表 Sechenov 常数(m^3/kmol),它随气体种类、电解质种类和温度而变化,它是 $\log\frac{C_w}{C_e}$ 对 C_B 作图所得的直线斜率。

几种电解质混合液中氧的溶解度与各种离子的离子强度之和有关:

$$\log\frac{C_w}{C_e}=\sum_i h_i I_i \tag{11.5-5}$$

$$I_i=\frac{1}{2}Z_i^2 C_{Bi} \tag{11.5-6}$$

式中 I_i——代表第 i 种离子的离子强度;

h_i——代表第 i 种离子的常数(m^3/mol);

Z_i——代表第 i 种离子的价数;

C_{Bi}——代表第 i 种离子的浓度(kmol/m^3)。

以上公式也适用于二氧化碳溶解度。

在许多非电解质溶液中氧的溶解度也可有类似(11.5-4)式所表达的规律:

$$\log\frac{C_w}{C_{nO_2}}=KC_n \tag{11.5-7}$$

对于非电解质混合溶液,它们的影响具有加和性:

$$\log\frac{C_w}{C_{nO_2}}=\sum_i K_i C_{ni} \tag{11.5-8}$$

式中 C_{nO_2}、C_n——分别代表氧在非电解质溶液中的溶解度和非电解质溶液的浓度(kg/m^3);

K、K_i——分别代表某种和第 i 种非电解质的常数(m^3/kg);

C_{ni}——代表第 i 种非电解质浓度(kg/m^3)。

表 11-9、表 11-10 和表 11-11 分别列出了一些阳离子、阴离子的 h_i 值以及非电解质常数(m^3/kg)K_i 值。对于浓度高于 200kg/m^3 的

蔗糖溶液,还可用下式代替(11.5-7)式计算氧的溶解度:

$$C_{no_2}=C_w(1-mC_n) \tag{11.5-9}$$

当蔗糖浓度在 200 ~ 600kg/m^3,温度为 25℃ 时,$m=9.04\times10^{-3}m^3/kg$;温度为 30℃ 时 $m=1.56\times10^{-3}m^3/kg$。对于二氧化碳的溶解度计算,25℃ 时 $m=6.87\times10^{-4}m^3/kg$。

表 11-9 一些阳离子的 h_i 值($m^3/kmol$)*

阳离子	$h_i(O_2)$			$h_i(CO_2)$
	20℃	25℃	37℃	25℃
H^+	−0.771	−0.776	−0.803	−0.319
Na^+	−0.570	−0.568	−0.577	−0.130
K^+	−0.593	−0.578	−0.578	−0.196
NH_4^+		−0.704	−0.681	−0.252
$N(C_2H_5)_4^+$			−0.709	
Mg^{2+}	−0.308	−0.297	−0.321	−0.078
Ca^{2-}	−0.293	−0.309	−0.316	−0.073
Mn^{2+}		−0.324	−0.325	−0.084
Fe^{2+}				−0.078
Co^{2+}			−0.317	
Ni^{2-}	−0.302		−0.318	
Cu^{2+}	−0.312		−0.325	−0.090
Zn^{2+}	−0.295		−0.310	
Al^{3-}	−0.210		0.221	−0.059
Fe^{3+}			−0.244	

* A. Schumpe etc. ,Biotech. Bioeng. ,20,145~150(1978);G. Quickeer etc. ,Biotech. Bioeng. ,23,635~650(1981);A. Schumpe etc. ,Adv. Biochem. Eng,24,1~38(1982)

表 11-10　一些阴离子的 h_i 值($m^3/kmol$)*

阳离子	$h_i(O_2)$			$h_i(CO_2)$
	20℃	25℃	37℃	25℃
Cl^-	0.843	0.849	0.861	0.339
I^-		0.784		0.309
OH^-	0.955	0.943	0.917	
NO_3^-	0.827	0.802	0.821	0.293
SCN^-			0.791	
HSO_4^-	0.954	0.955	0.935	0.436
HCO_3^-		1.076	0.861	
$H_2PO_4^-$		0.997		
SO_4^{2-}	0.458	0.460	0.448	0.213
CO_3^{2-}		0.467	0.447	
HPO_4^{2}		0.477		
PO_4^{3}		0.308		

* 文献同表 11-9

表 11-11　氧和二氧化碳在有机物料溶液中的 K_i 值($10^{-4}m^3/kg$)*

物料名称	浓度范围 kg/m^3	温度℃	$K(O_2)$	$K(CO_2)$
葡萄糖	0～450	25	6.58	6.07
	0～200	37	6.78	
	0～300	15		6.63
乳糖(工业)	0～300	25	5.71	
	0～250	25		3.48
蔗糖	0～200	25	4.36	2.94
	0～700	15～45	5.99	
	0～200	37	5.19	
糖蜜(灭菌后)	0～240	25	4.03	
糊精	0～200	37	5.02	
淀粉	0～200	37	6.35	

续表

物料名称	浓度范围 kg/m³	温度℃	$K(O_2)$	$K(CO_2)$
糖原	0～250	37	6.59	
葡萄糖胺	0～300	37	11.23	
1-磷酸葡萄糖	0～200	37	11.87	
ATP	0～200	37	7.10	
ADP	0～200	37	6.35	
葡萄糖酸	0～500	25	3.92	
柠檬酸	0～200	25	5.09	2.68
尿素	0～300	37	3.74	
甘油	0～300	37	4.07	
白蛋白(牛)	0～80	25	1.60	
	0～200	37	1.81	
白蛋白(鸡)	0～200	37	3.23	
α-球蛋白	0～100	37	3.05	
β-球蛋白	0～150	37	3.72	
γ-球蛋白	0～200	37	2.56	
血红蛋白	0～250	37	－0.30	
羟脯氨酸	0～200	37	7.81	
β-丙氨酸	0～300	37	10.38	
甘氨酸	0～200	37	12.46	
赖氨酸	0～300	37	13.45	
半胱氨酸	0～200	37	22.82	
胰岛素	0～200	37	5.48	
酪蛋白胨(灭菌后)	0～60	30	4.3	
肉膏(灭菌后)	0～60	30	5.7	
酵母膏(灭菌后)	0～60	30	6.2	
棉子粉(灭菌后)	0～80	25	1.5	

* A. Schumpe etc., Biotech. Bioeng., 20, 145～150(1978)

由于培养基是含多种有机物料及无机盐，其溶解氧饱和浓度可用下式计算：

$$\log \frac{C_w}{C_{e,n}} = \sum_i h_i I_i + \sum_j K_j C_{n,j} \qquad (11.5\text{-}10)$$

Quicker 等应用上式计算，在 25℃时含糖和无机盐的混合溶液中，溶解氧浓度与实验值对比，误差小于 0.05%。一些培养基在 121℃灭菌 20min 后，冷却到 25℃，取样测定氧的溶解度，除了个别之外，一般误差小于 2%。在培养过程中根据碳源的消耗和调节 pH 所加的酸碱量，可求出培养液中氧溶解度的变化。

11.5.3 影响氧分子供给的因素

除了上述氧的各串联传递每项存在的阻力，影响氧分子对细胞的供应外，一般情况，培养液中溶质浓度越高，氧的溶解度越低，氧传递的驱动力就越小，氧的供应也即随之减少。由于细胞对培养基的营养物质有一定浓度要求，所以不可能无限止降低培养基中物料浓度来提高氧的溶解浓度。根据亨利定律，提高气相中氧分压便可提高培养液中溶解氧浓度，从而提高氧传递的驱动力。提高气相氧分压的最通常的方法是提高反应器中气相总压力，不过二氧化碳的分压也会增高得更多，从而对一些细胞培养过程可能产生不良影响。

增加空气中氧的相对含量，以富氧空气通入反应器。这是一种较好的提高氧分压和溶解氧的方法。制备富氧空气的主要方法有：(1)深冷分离所得氧的纯度可达 99.6%～99.8%；(2)压缩空气通过吸附剂柱，吸附分离氮和二氧化碳，制取约 90%～95% 纯度氧气；(3)利用高分子膜对氧进行膜分离，可得含氧量 30% 左右富氧空气。富氧空气通入反应器，可提高氧传递驱动力和速率，使培养液中细胞浓度达到很高的程度。值得注意，过高的富氧通入可能会对某些细胞生长产生不良影响。此外，细胞代谢产生的二氧化碳积累，造成它的分压升高，则细胞生长速率会下降，所以还需采取适当排走二氧化碳之方法。

其次，气液界面的比表面积会影响氧分子的传递速率，即单位体

积培养液中气泡的总面积与气泡平均直径成反比，而与气体截留率成正比。因此增加气-液接触的总面积，即通入的气泡分散得更细（平均直径更小），对氧气传送的截面积增得越大，则液体对氧的截留率越高。提高氧气的传送速率对耗氧细胞的培养是有利的。不过消耗通气的功率会增多。

氧在气泡周围液膜中的传递是动态过程，按照 Fick 第二定律，液膜中溶氧浓度随时间的变化率与氧的扩散系数和氧浓度梯度随距离的变化率成正比，而液膜中氧的传递系数又与液相中扩散系数的平方根成正比，于是温度和液体粘度都会影响气体在液体中的扩散系数，从而影响供氧的传递速率。

实验发现操作条件（如搅拌转速，搅拌功率、通气速度等）对液膜中氧传递系数与气-液比表面积（m^2/m^3）的乘积有很大影响。增加单位液体体积的搅拌功率对氧的传递比增大通气量有效。机械搅拌可将通入液体的空气分散成细小气泡以增大气-液比表面积，并阻止气泡凝合；能造成液体湍流，有利于减小滞流液膜厚度，减少传递阻力；也能造成液体涡流，延长气泡在液体中的停留时间；搅拌也使培养液中细胞和营养物质包括溶解氧得到均匀分散，避免或减少缺氧区的形成。但过分剧烈的机械搅拌会产生强劲的剪切作用，可能损伤细胞，还产生大量搅拌热不利于氧的溶解和反应器的恒温控制。此外，通气量增得太大会引起搅拌在大量空气泡中空转。

不少研究发现，上述的一些影响因素也影响着细胞外液膜中氧传递，同样，氧的传递也与上述操作条件有关，还与液体性质（如粘度、表面张力等）有关，若细胞聚集成团很容易造成细胞团中央处于缺氧状态，细胞耗氧速率越大，传递速率越小，细胞团内部缺氧就越严重。如细胞不聚集成团而悬浮在培养液中，在细胞浓度较大时，气泡的液膜阻力相对地变大而成为供氧的控制步骤。

11.6　灭菌技术

利用酵菌生产需要的产品,必须采用特定的纯菌种进行培养(称纯培养),但是环境中存在着非常多的各种杂菌,很易混入发酵设备或培养基内,可能会与生产菌争营养,使产品产量锐减,夹杂杂菌的代谢产物,有的产生异味,有的会使产品使用出现过敏等现象,而后处理提纯又很困难,引起报废。所以对微生物的培养(除了污水处理在事后灭菌外),均需预先对设备、管道、使用的工具、配制的培养基和通入空气等进行严格的灭菌,要绝对杜绝杂菌通过种种渠道进入系统。生产过程至结束后产品、废水、废气也需除菌或灭菌以免污染环境。

灭菌(或除菌)的方法很多,如加热法、化学法、紫外线辐射法、过滤法等,需针对性选用其中合适的方法,一般常用的是加热法和过滤法。

11.6.1　微生物加热致死动力学

不同微生物加热致死的难易和快慢经常都是不一样的。微生物受热致死的主要原因是高温使微生物体内的一些对生命至关重要的蛋白质(如酶等)发生凝聚、变构变性,或核酸类生命物质遭到破坏,从而导致微生物无法生存而死亡。最常见的有对数死亡律和非对数死亡律。

对数死亡律是微生物的死亡速率遵循一级衰减率所呈现的规律,即微生物数量越多,其死亡速率越快:

$$-\frac{dN}{dt}=k_dN \tag{11.6-1}$$

式中　N——代表活菌体浓度,以个数/ml 或 g/ml 表示;

k_d——代表比死亡速率常数(min^{-1});

t——代表时间(min)。

由边界条件,起始 $t=t_0$ 时,$N=N_0$,而 t 时为 N,积分(11.6-1)式,可

得

$$\ln\frac{N}{N_o}=-k_d t \quad 或\ t=2.303\frac{1}{k_d}\log\frac{N_o}{N} \tag{11.6-2}$$

$$N=N_o\exp(-k_d t) \tag{11.6-3}$$

$\ln\frac{N}{N_o}$对 t 作图呈直线，直线斜率数值上等于比死亡速率常数 k_d。它的绝对值反映了微生物耐热性强弱，k_d 值越小，微生物越不易加热致死。这描述了作为普通营养细胞之典型代表大肠杆菌等在加热下的行为。

例如 115.5℃时芽孢 $k_d=1.0\text{min}^{-1}$，营养细胞 $k_d=10^{10}\text{min}^{-1}$，可以认为芽孢是较不易加热致死的，而营养细胞易加热致死。嗜热脂肪芽孢杆菌在 121℃的 k_d 值为 0.77min^{-1}，所以较难加热致死。

非对数热死亡律是细胞芽孢受热死亡的动力学行为。Prokop 和 Humphrey 提出的模型认为，芽孢的受热死亡不是突然的，而是渐变的，芽孢从耐热的芽孢（R 型）要经历一个对热敏感的中间态芽孢（S 型），方转变为死亡（D 型）。此过程的动力学方程为

$$N_R\xrightarrow{k_R}N_S\xrightarrow{k_s}N_D$$

$$\frac{dN_R}{dt}=-k_R N_R \tag{11.6-4}$$

$$\frac{dN_S}{dt}=k_R N_R-k_S N_S \tag{11.6-5}$$

式中 N_R、N_S、N_D——分别代表 R 型、S 型、D 型芽孢的浓度（芽孢数/ml 或 g 芽胞/ml）；

k_R、k_S——分别代表 R 型、S 型的比失活速率常数（min^{-1}）；

t——代表经历的时间（min）。

该联立微分方程组解为

$$\frac{N}{N_o}=\frac{k_R}{k_R-k_S}\left[\exp(k_S t)-\frac{k_S}{k_R}\exp(-k_R t)\right] \tag{11.6-6}$$

式中　N——代表在 t 时间具有活力的芽孢浓度，即 $N = N_R + N_S$；

N_o——代表最初的活芽孢浓度。

如果以适当动力学常数 k_R 和 k_S 代入，在不同温度下，$\frac{N}{N_o}$对 t 作图所示曲线于图 11-15。温度对死亡速率的影响是通过死亡速率常数 k 与温度间关系而呈现的。在一定温度变化范围内，也可利用阿累尼乌斯公式表达，即

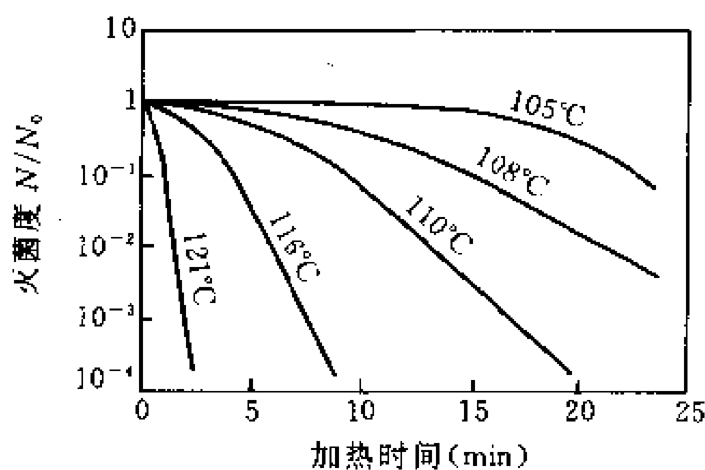


图 11-15　细菌芽孢的典型受热死亡曲线

$$k = A\exp(-\Delta E/RT) \text{或} \ln k = \ln A - \frac{\Delta E}{RT} \qquad (11.6\text{-}7)$$

式中　A——代表频率常数(min^{-1})；

ΔE——代表死亡活化能(J/mol)；

R——代表气体常数(8.314J/mol×K)；

T——代表绝对温度(K)；

ΔE 可作为微生物加热死亡时对温度的敏感性度量，此值越大，微生物死亡速率随温度的变化越敏感，这是一个十分重要的灭菌参数。

11.6.2　高温瞬时灭菌法

在一般情况下，微生物在受热死亡时的活化能是比营养成分受热破坏的活化能要高得多。例如嗜热脂肪芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和肉毒梭菌的 ΔE(J/mol)分别为 2.83×10^5、3.18×10^5 和 $3.43\times$

10^5,而营养成分如叶酸、B_{12}、B_1、B_2 和葡萄糖的 ΔE(J/mol)依次为 7.03×10^4、9.63×10^4、9.21×10^4、9.88×10^4 和 1.00×10^5。当温度升高后,微生物死亡速率的增快要比营养成分的破坏速率的增加大得多。这是采用高温、瞬时灭菌法的理论基础。

以嗜热脂肪芽孢杆菌的受热死亡与维生素 B_1 受热分解对比为例,当温度从 105℃ 升高至 130℃ 时,芽孢的 k 值由 0.1min^{-1} 增至 26.82min^{-1},增大约 268 倍,而 B_1 破坏的 k 值只从 0.019 增至 0.117,仅是原来的 6.16 倍。可见温度升高对营养成分破坏的影响远小于对芽孢的致死。温度升高,芽孢的 k 值增得很大,于是加热时间 t 可尽量缩短以减少营养物质的总破坏量。由此表明,在不降低规定的灭菌前提下($N/N_0=10^{-16}$),在灭菌温度 150℃,灭菌时间只要 0.025min(或 1.5s),此时 B_1 的破坏便可减少至 1.0%。

培养基的灭菌可采用间歇灭菌和连续灭菌方法:

(1)间歇操作是将培养基放在发酵罐内一起加热到规定的灭菌温度,适当维持一段时间灭菌温度,然后冷却,它由上述三个不同阶段组成,均有灭菌作用。加热和冷却阶段因温度随时间变化,所以比死亡速率常数 k 也随之变化。但受多种因素(如培养基性质、装置形式与结构等等)不同程度地极复杂的影响。确定灭菌温度和灭菌时间是灭菌操作的关键,升温速度与冷却速度也需恰当。原则上,系统经灭菌后,不允许有一个杂菌残留,否则会导致这批发酵生产的失败。

(2)连续灭菌操作是将加热、保温与冷却这三个阶段分别在加热设备、保温设备和冷却设备中连续进行,物料流经三个设备形成串联的三个过程。该操作需要物料流经三个设备时有一定的停留时间,以保证物料能在适当时间内升到规定温度,并有适当的保温时间和冷却速度。物料流动中流体的流速中心处最大,近壁处流速递减,因此,各层流体在保温阶段的停留时间也就各不相同,以半径方向形成停留时间的分布。若以平均停留时间(或平均流速)来作为保温时间,物料中心部位流速大于平均流速,它在保温阶段的停留时间短于

平均停留时间，这样就达不到规定的灭菌要求。如果按物料中心最大流速考虑，有可能因停留时间过长而部分培养基遭受破坏。所以物料在灭菌过程中，必须有适当的保温时间，这在实际操作中较难掌握。连续灭菌可通过多种装置和操作实现，基本的有两种：一种是热交换器式的间接加热和冷却；另一种是用蒸气直接加热至灭菌温度，经保温后急剧地冷却。

间歇灭菌和连续灭菌各有优缺点：

连续灭菌操作容易将灭菌温度提到较高，可实现高温瞬时灭菌法，并减少培养基中营养物质的破坏而损失，从而改善产品的收率和质量。其操作条件可恒定，易于实现自控，提高热利用率。

间歇灭菌操作设备简单，操作要求的条件较低，便于手动和小批量生产，还适用于介质中含大量固体物质的场合。

加热灭菌在微生物聚集一起呈固体颗粒状态或有固体颗粒存在的情况下，微生物在颗粒内部得到庇护，不容易受热致死，因而需要更强烈地加热，进行高温高压灭菌。

11.6.3 空气灭菌与过滤除菌法

需氧微生物在发酵生产过程中，需要氧气的供应，这氧气通常是由通入的空气提供。但空气中一般都夹带有大量的各种各样飘浮的杂菌，这些杂菌一旦进入培养系统后便会与生产菌竞争繁殖，并产生各种干扰的代谢物，影响产品质量而破坏生产正常进行。

对空气除菌的要求，应根据具体情况而定，对氨基酸和抗生素的发酵生产过程，因生产菌抗杂菌能力弱而发酵周期长，除菌的要求高(千分之一次中有一次可能残留一个杂菌)，万一杂菌混入，生产的抗生素可能会呈现过敏现象，重则致人休克。酵母的培养过程可在 pH 较低(pH=3~4)的情况下进行，且繁殖快和能抗杂菌侵袭，因而除菌要求可以低些(百分之一次中有一次可能残留一个杂菌)。空气除菌方法被广泛应用的有(干)热杀菌和过滤除菌法等。其它的如辐照法、化学法、静电除菌法等，一般限于小规模或实验中使用。

(一)热杀菌法

空气(干)热杀菌法是藉加热微生物使其体内蛋白质(酶)变性而致死,一般不用通入蒸汽这种浪费能源的不合理方法,而用其它载热体加热。现常用空气压缩时产生的高温来杀菌。国外在丙酮—丁醇及谷氨酸等生产中使用了此法。欲杀死空气中杂菌,200℃时需15.1秒,250℃需5.1秒,300℃时需2.1秒,而350℃仅需1.05秒。干热杀菌法通常可先利用低温热源(或废热)预热空气至60~70℃,然后由压缩机压缩,按多变压缩公式计算,即

$$T_2 = T_1\left(\frac{P_2}{P_1}\right)^{\frac{m-1}{m}} \tag{11.6-8}$$

式中 P_1、P_2——分别代表气体初压和终压;

$\frac{P_2}{P_1}$——代表压缩比;

T_1、T_2——分别代表进压缩机气体始温(K)和压缩后终温(K);

m——代表多变指数。

若压缩比 $P_2/P_1 = 6$,取多变指数 $m = 1.25$,则压缩机出气温度约在200℃以上,并让空气在200℃以上温度段停留足够时间以便杀死杂菌。维持温度的装置常用保温容器或多程列管换热器,以代替很长的保温管道,实践中发现多程列管换热器的效果最好。

(二)过滤除菌法

空气过滤除菌法是让空气通过过滤介质,空气中飘浮的微生物可被阻截于外,从而获得无菌空气。空气过滤有两种方式:绝对过滤所用过滤介质的滤孔小于细菌颗粒,例如超滤膜这样就可将细菌截留;另一种称深层过滤,它藉介质滤孔在滤层内呈曲折通道并具有吸附细菌颗粒的表面作用,如棉花、活性炭、玻璃纤维、合成纤维及各种有机或无机的烧结材料,从而把细菌截留在通道中。超细纤维及其制成的介质已成为空气过滤除菌广泛使用的材料。值得注意,空气经压缩机压缩后,会夹带大油滴和水雾,如果没有预先除去,经过滤

介质时会粘附于通道表面，增加空气通过的阻力，或阻塞通道，或使过滤介质结块而完全丧失其除菌能力。

深层过滤是基于滤层纤维网络的层层阻截，迫使气体在通过过滤介质的流动过程中，呈现无数次变速、变方向的迂绕运动，导致菌体惯性撞击滤层纤维而被截留，或在随气流飘动中或者在布朗扩散运动中与滤层纤维表面接触而被纤维表面作用捕集，还有菌体的重力沉降和菌体与纤维间摩擦所产生的静电引力起着一定的截留作用。

(1)惯性撞击截留作用

滤层纤维交织成无数的层层网格，纤维直径越小和填充密度越大，则网格越紧密。由于含微生物的空气被迫穿过纤维间隙时必须不断地改变流动方向和速度大小，而菌体的惯性远大于空气，便撞击纤维表面而被拦截在其上。这种捕集菌体的作用为惯性撞击截留作用。其捕集效率除与菌体密度和其直径平方成正比外，还与空气在纤维间真实速度在一定范围内成正比关系。纤维直径越大和空气粘度越大，就越不利于捕集效率。

空气流速下降到某一值(惯性碰撞的临界气速)时，菌体的惯性力便不足以迫使菌体碰撞纤维而脱离气流，菌体会随着气流飘过而使捕集效率为零。所以操作气流速度必须大于惯性碰撞的临界气速。在其它条件一定时，增加气流速度，菌体运动的惯性力也随之增大，被纤维捕集的机会也增加。

(2)表面作用的拦截作用

采用的纤维越细，纤维的表面积就越大，表面作用越显著。若气流速度降到临界速度以下，气流中部分菌体在接触纤维表面时会被纤维表面粘附而除去，这就明显地呈现出表面作用所导致的拦截截留效应。所以表面粘附拦截也是过滤除菌的主要原理之一。

在一般情况下，气流中所夹带的菌体能被拦截的极限条件是菌体到达离纤维表面二分之一菌体直径的距离空间，即凡是在气流中离纤维表面二分之一菌体直径距离处的菌体均会被纤维粘附拦截而

捕集，所以菌体直径越大，被拦截捕集的机会就越多。

(3)布朗扩散截留作用

直径很小的菌体在缓慢气流中会产生一种不规则的、曲折的直线运动(即布朗运动)，布朗运动的范围很小，所以只有在缓慢流动的气流中和极小的纤维间隙间。菌体才会明显地呈现出这种布朗扩散作用，从而在与纤维接触中被捕集。如菌体的布朗运动最大距离是x_0，在气流中离纤维x_0以内的菌体，均有可能因布朗扩散运动与纤维接触而被捕集。

以上三个过滤截留的主要因素，在高气速时惯性碰撞起主导作用，但在气速很低时，表面拦截和布朗扩散截留等机制呈现较大除菌能力。因此，在空气过滤时，必须注意操作气速的变化和为防止菌体穿透而设计过滤层的必要厚度，以及过滤介质性能的优劣。

11.7 酶的生产和应用

当前酶的生产还是从生物体抽提分离得到的，而化学合成途径虽然已在研究中取得一定进展，但以化学合成方法进行酶生产的途径，尚需进一步开拓。

11.7.1 酶的发酵生产

酶的大规模生产主要依赖于培养微生物进行发酵生产。微生物的种类繁多，动植物体内的酶几乎都能从微生物中得到。

(一)生产菌必须符合的要求

(1)生产菌不会致病，在培养生产中也不产生毒素；

(2)生产菌不易变异退化，不会感染噬菌体；

(3)生产菌产特定酶量高，而且酶的性质符合应用的需要；

(4)能用廉价原料，易培养。生产酶时发酵周期短；

(5)能分离和筛选获得更适宜的生产菌株，最好是产生胞外酶的菌株。

(二)产酶菌的培养

筛选出好的菌株，就需给予适当的培养繁殖。

(1)培养方法

固体培养方法是以麸皮、米糠为基本原料，适当地加入无机盐和适量的水分(通常50%左右)，经蒸煮杀菌后接种进行培养。培养方法有浅盘培养、转鼓培养和通风式厚层发酵。浅盘中培养基一般不超过5cm，操作简单。转鼓中培养基在鼓内一直翻动，以利于充分通气，散发部分发酵热以维持培养温度。通风式厚层发酵，培养基厚度可达20～30cm。通常酶菌会在固态培养基中菌丝体生长较好，产酶率也较高。但固体培养料往往利用不完全，劳动量大。

液体培养方法是以配制的液体培养基，在发酵罐内进行搅拌通气的培养，这是目前酶制剂和其它发酵产品生产的主要培养方法。它需要一定要求的设备和技术条件，原料利用率较高，培养条件容易控制。液体培养有两种操作：

(A)两步培养：即先在适合菌体生长的条件下培养繁殖，然后再在适合生产特定酶的条件下培养产酶，产酶率可达很高。

(B)连续分段发酵：即先培养菌体至指数生长期，然后一方面连续补充新鲜培养基，一方面以同样速度不断地放出含产物的培养液，要求二者速度与菌体生长速度一致，使菌体生长处于稳定态条件。这样操作可提高劳动生产率，还可能避免酶产生太多后的反馈阻遏，使产酶率显著地提高。

(2)培养条件

生产菌的培养条件有配制合适组成的培养基、培养基的pH和培养温度等。它们既影响菌体的生长，也影响酶的生产。所以选择培养条件时不仅需要考虑菌生长的要求，而且又须兼顾酶合成的需要。不同的生产菌或不同的产品酶所需的培养条件往往是很不相同的。有的菌可利用多种碳源均能生长和生产酶，有的菌却只要求特定的碳源才能合成酶。需要的氮源也很不一样，有的菌喜欢有机氮，而有的却好利用无机氮，氮源性质会影响菌的生长和产酶，例如硫酸铵是酸性生理氮源，硝酸钠是碱性生理氮源，它们被菌体代谢后会引

起培养基的 pH 发生变化,从而影响菌体生长和产酶。

培养基的 pH 和培养温度的影响也十分复杂,在一般情况下,pH 均调配至近中性,温度控制在 37℃左右,空气要有一定的湿度。

优良菌种的筛选,适宜的培养条件是获得高产量的重要技术条件,而掌握适宜的采酶时机是高产实收的重要措施之一。

11.7.2 提高酶产量的有效方法

在正常情况下,酶的合成和其它蛋白质一样,是受到复制、转录和翻译等各种水平上组成的合成调节机构的调控。如果设法使这种调控向高产酶转变,便有希望大幅度地提高酶产量。

根据原核细胞的酶合成机理,酶合成主要受到转录速度的控制。这与操纵子中操纵基因起"开关"作用有关。操纵子是由结构基因、操纵基因和起动基因等组成,结构基因中载有特定酶的结构密码,例如大肠杆菌乳糖操纵子中结构基因含有 β-半乳糖苷转乙酰酶基因等。有关酶的结构密码会决定酶的结构和性质。

当操纵基因"开"时,附着在启动基因上的依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶(DNA-dependent RNA-Polymerase,DDRP),即能超越它的控制,沿着结构基因移动,并以结构基因为模板进行转录,合成酶的 mRNA,然后 mRNA 再通过翻译,合成有关的酶。如果操纵基因"关"时,DRRP 的移动便受到阻遏,也就不能合成有关的酶。然而操纵基因的开关又受到结合在操纵子上的调节基因控制,由调节基因密码合成的多数调节蛋白会表现出阻遏作用,这类调节蛋白称作阻遏蛋白。在某些酶的合成调节机构中,阻遏蛋白能直接和操纵基因结合而使它关闭,阻遏转录进行;在另一些酶的合成调节机构中,阻遏蛋白不能直接和操纵基因结合,只有在相应的效应物存在时,形成阻遏蛋白-效应络合物后,才能进而与操纵基因结合而使之关闭,这种效应物称为辅阻遏物。

阻遏在细胞中,可以有尾产物阻遏和分解代谢产物阻遏两种情况。许多参与合成代谢的酶通常在细胞生长发育过程中是以一定速度正常合成的,但当它们的代谢产物积累到一定浓度水平上而能满

足生物需要之后，就会发生对这些酶的合成起阻遏作用。这种现象称反馈阻遏或尾产物阻遏(例如赖氨酸会阻遏天冬氨酸激酶的合成，苏氨酸阻遏高丝氨酸脱氢酶)。它的机理可能阻遏蛋白本身没有和操纵基因结合的能力，因而在正常情况下不起阻遏作用，但能将酶的产物作为效应物(或称辅阻遏物)相互结合而发生别构效应，于是转变成能和操纵基因结合，从而阻遏酶的合成。某些参与分解代谢的酶也可能受这类调节方式直接或间接控制。如果抽提掉这类尾产物，便能消除这类阻遏作用。当细胞在易被利用的葡萄糖等碳源中生长时，有些酶特别是参与分解代谢的酶类合成往往受到分解代谢产物的阻遏。这类阻遏与 cAMP 有关，cAMP 是 cAMP 受体蛋白(cAMP receptor Protein，CRP)活化的必要因子，只有 CRP 被 cAMP 活化而一起进入其作用位点上时，DDRP 才能附到启动基因上，从而推动转录的进行。葡萄糖等的分解产物能影响 cAMP 的合成和分解，使 cAMP 浓度降低，导致无法形成 cAMP-CRP 络合物而阻遏转录的进行。这种阻遏可以通过添加 cAMP 的方法而给予减少或消除。

诱导和阻遏是具体调节的两种方式，某些酶(如参加分解代谢的酶类：淀粉酶、纤维素酶等)在通常情况下合成极少或不被合成，在“诱导物”存在时便能大量合成，这种现象称诱导。诱导的机制是：在合成调节系统中调节基因产生阻遏蛋白是一种别构蛋白，它既能直接和操纵基因结合，阻遏酶的合成；也能和诱导物结合并改变构象，从而失去和操纵基因结合的能力，使“开关”打开，因此，加入诱导物能诱导酶的大量合成。

综上所述，酶的合成调节机制在生物体内有效地调控着酶的合成，以保证生命活动中代谢的平衡。如果设法调动这种调节机构，向某些酶产量能大幅度地提高的方向转变，参与分解代谢的酶类产量可能有千倍的增加，参与合成代谢的酶类也可有百倍产量的提高。人们早已开始从条件控制和遗传控制两方面的研究。

条件控制是指设法找到合适的诱导物，通过添加诱导物来提高

酶产量,或找出适宜的降低阻遏物浓度的方法,以消除酶生产中的阻遏机制。

遗传控制是指通过诱变和挑选基因突然变异的菌种(株)或基因重组的手段来改变菌种(株),使其不受阻遏调控。然可引起菌种突变的因素很多,最常见的物理方法有紫外线、γ-射线、高能电子和快中子等照射。例如,巨大芽孢杆菌生产青霉素酰化霉时需要苯乙酸诱导,若以紫外线照射以获得变异株便无需苯乙酸的诱导了。化学方法是以亚硝基胍、亚硝酸等处理。基因重组的基因工程在酶生产上可能所起的作用是增加基因的拷贝数,促进表达而提高酶产量;通过基因接种,使动物、植物中产生的酶转由微生物进行生产;作为定向改造酶(即蛋白质工程)的一种生物技术。

酶的生产除了诱变或构建以获得优良的生产菌株外,还需要筛选、纯化等技措,但要有效地进行生产,必须探索培养菌株和产酶的最适宜条件和措施,如合理的培养方法、适宜的培养基、培养温度、pH 和通气量等,以及生产工艺条件、采酶技术、灭菌措施与制剂工艺。

11.8 酶的固定化

酶的固定化是通过物理化学方法将酶固定于高分子支持物或载体上,成为酶制剂的一种生物技术,现普遍称作固定化酶(immobilized enzyme),实际上也包括固定化菌体、固定化细胞、固定化细胞器和固定化辅酶等。固定化酶的研究和发展,可以改善生物催化剂——酶蛋白质的稳定性、有利于生产连续化和自动化。

11.8.1 酶的固定化方法

酶的固定化方法大体上可概括为三大类型:载体结合法、交联法和包埋法。

(一)载体结合法

利用载体的表面作用结合酶分子,有物理吸附法、离子交换吸附

法和共价偶联法。

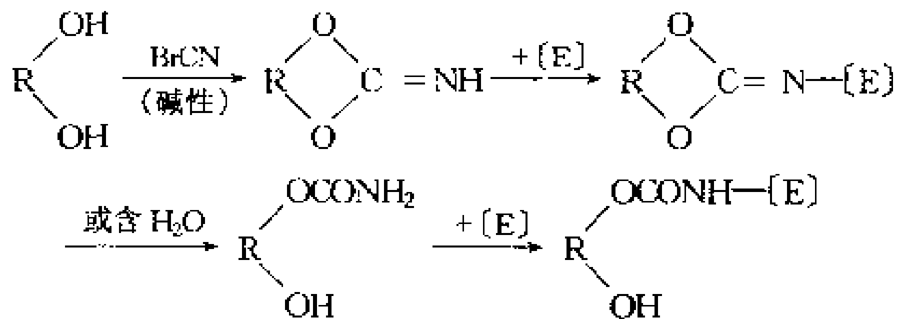
(1)吸附法的优点是操作简便,条件温和,吸附剂(载体)可再生和反复使用,酶的活性中心不易被破坏,高级结构的变化也少,但是酶和载体的吸附作用较弱,容易在其它 pH 环境下,或高盐浓度、高底物浓度条件或高温情况下解吸脱落。载体有活性炭、酸性白土、高岭石、氧化铝、硅胶、陶瓷玻璃等,还有淀粉、合成树脂、丁基或己基—葡聚糖凝胶、纤维素衍生物等。离子交换吸附的载体有多糖类离子交换剂和合成高分子离子交换树脂等。

(2)共价偶联法,这是借助共价键将不影响酶活性中心的侧链基团和载体的功能基团进行偶联而制取固定化酶的方法。这种方法获得的固定化酶,结合牢固、稳定性好,有利于连续使用,不过,在制备时共价偶联反应易引起酶失效。共价偶联常用的载体是纤维素、琼脂糖及聚丙烯酰胺胶或多孔玻璃等。有几种常用的偶联反应:

(A)重氮法,例如:



(B)溴化氰法,例如:

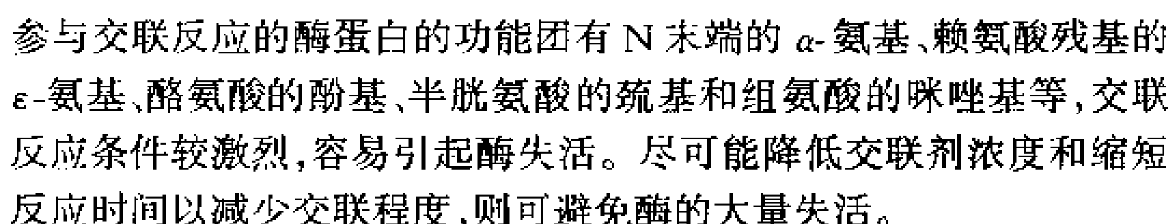


(C)烷化法,例如:



(二)交联法

这是不用载体,而是以双功能或多功能试剂在酶分子间、或酶分子与惰性蛋白间、甚至与微生物细胞间进行交联反应,制得固定化酶的一种方法。作为交联剂,常用的有戊二醛,其反应如下:



参与交联反应的酶蛋白的功能团有N末端的α-氨基、赖氨酸残基的ε-氨基、酪氨酸的酚基、半胱氨酸的巯基和组氨酸的咪唑基等，交联反应条件较激烈，容易引起酶失活。尽可能降低交联剂浓度和缩短反应时间以减少交联程度，则可避免酶的大量失活。

(三)包埋法

包埋法有网格包埋和微囊包埋两种类型：网格型是将酶或微生物包埋在高分子凝胶细微网格中；微囊型是将酶或微生物包埋在高分子半透膜中。包埋法一般不一定需要高分子与酶蛋白的氨基酸残基进行结合，有的是包合物的一种型式，于是很少影响酶的高级结构的改变，这种包埋法可应用于许多酶、微生物或细胞器的固定化。但需采用恰当的高分子聚合反应条件进行聚合包埋，否则会使酶容易失活。由于小分子底物和产物才能通过高分子凝胶的网格扩散，包埋法不适用于对作用大分子底物和生产大分子产物的酶固定化，扩散阻力会大大地降低酶的活力。

(1)网格型包埋

常用的包埋剂有聚丙烯酰胺、聚乙烯醇和光敏树脂等合成高分子化合物，例如先将酶和丙烯酰胺单体(或预聚物)分散在疏水介质中，然后以N,N′—甲叉双烯酰胺(BIS)为交联剂进行聚合，从而制成包埋物。其它的包埋剂还有淀物胶、硅橡胶、明胶、海藻酸等，这是以在酶(或微生物)存在下进行凝胶化的方法制得包埋物。现在已开拓的包埋剂有对γ射线敏感的聚乙烯吡咯烷、聚乙烯醇、聚α-羟乙基丙烯酸等聚合胶；光敏性聚合树脂如水溶性的ENT，水不溶性的ENTP(两者分别是以聚乙二醇或聚丙二醇为主链成分而两末端具有丙烯酰基的光交联预聚物)，它们只要在光增敏剂(安息香乙醚或

安息香异丁醚)存在下,50℃～60℃时混合溶解,冷却至室温,再与酶液(或菌体悬浮液)混合,搅匀,铺于透明聚酯膜上,以紫外光照射数分钟即可得到固定化酶。若它们以不同比例混合,就可调节固定化酶的亲水性和疏水性等。

(2)微囊型包埋

这是酶分子被容许小分子底物和产物自由出入的半透膜包埋于微囊内的方法,让囊膜的总表面尽量大,使小分子物质出入交换迅速。普通使用的微胶囊型包埋剂有尼龙膜、火棉胶和醋酸纤维等。例如,尼龙膜一般采用界面聚合法,即将含有酶的1,6-己二胺水溶液与溶有疏水性癸二酰氯的有机溶剂(氯仿或甲苯)在搅拌下进行混合,同时加入Span(山梨糖酐脂肪酸酯,油包水非离子型表面活性剂)使其乳化,让乙二胺和癸二酰氯这两种单体在水和有机溶剂的界面上聚合,形成包埋酶的尼龙膜球粒,用Tween 20(聚氧乙烯山梨糖醇酐月桂酸酯,水溶性表面活性剂)使之破乳化后即可得所需要微囊包埋酶。若用2,4-甲苯二异氰酸酯代替癸二酰氯,便能得到多脲微胶囊。

对于火棉胶(硝酸纤维素)或醋酸纤维素通常是采用界面凝聚法,可先将酶的水溶液在含硝酸纤维素的乙醚中乳化分散,然后加入苯甲酸丁酯使硝酸纤维素在酶滴周围凝聚,最后用Tween20破乳化后,便得到含酶的火棉胶微囊。如采用醋酸纤维素作微囊,可得纤维包埋酶,这种纤维表面积大,包埋的容量也大,稳定性好。控制凝聚条件还可调节纤维孔径。

除了以上所述之外,有关包埋技术酶固定化方法很多,在此限于篇幅,不再作介绍。细胞的固定化往往可以代替酶的固定化而省去酶的分离提纯,其采取方法类同于酶的固定化方法,其中借助物理化学技术措施以包埋法用得较多。辅酶物质也可实现固定化,一般采用载体共价偶联法。

11.8.2 固定化对酶性质的影响

酶固定化后可能对酶及其所处环境发生一定的影响,于是固定

化酶会呈现出与“游离”酶有所不同的性态。

(一)固定化对酶活性及酶催化系统的影响

影响因素大致上有以下几种:

(1)构象改变

酶在固定化过程中与载体的相互作用会引起酶的活性中心之构象发生变化,导致酶活性下降效应;

(2)立体屏蔽

由于载体的孔隙大小或固定化方式与位置不当,造成影响酶活性中心的空间障碍,使底物等无法和酶活性中心接触,导致不能发挥酶的催化功能;

(3)微扰效应与分配效应

酶固定化支持物——载体的亲水或疏水性质和介质的介电常数等产生的微扰效应,可以影响酶的催化性能。载体的亲水或疏水性质也使固定化酶紧邻的局部微观环境与宏观体系不同,导致了底物、产物及其它效应物在微观环境与宏观体系间发生不等分配,改变了酶参与的反应系统的组成平衡,从而影响酶催化的反应速度,分配效应可利用分配系数 ρ 进行定量描述,即

$$\rho = [C]_i/[C]_o \qquad (11.8\text{-}1)$$

式中 $[C]_i$、$[C]_o$——分别代表底物或其它效应物的局部浓度和总体浓度。

根据 Boltgmann 定则

$$\rho = \exp(-Ze\varphi/k_B T) \qquad (11.8\text{-}2)$$

则

$$[C]_i = [C]_o \exp\left(-\frac{Ze\varphi}{k_B T}\right) \qquad (11.8\text{-}3)$$

式中 φ——代表静电位;

Ze——代表溶质电荷;

k_B——代表 Boltgmann 常数。

由上可知,当载体与溶质具有相同电荷时,$[C]_i \leqslant [C]_o$;如果两

者带相反电荷时，$[C]_i \geqslant [C]_o$。

若只有底物分配效应的影响时

$$v = \frac{v_m[C_S]\exp\left(-\frac{Ze\varphi}{k_BT}\right)}{K_M + [C_S]\exp(-Ze\varphi/k_BT)} = v_m[C_S]/K'_M + [C_S]$$

(11.8-4)

$$K'_M = K_M/\exp\left(-\frac{Ze\varphi}{k_BT}\right) \qquad (11.8\text{-}5)$$

可见 $$K'_M = \frac{K_M}{\rho}$$

上式说明，在分配效应影响下，米氏常数 K_M 发生了变化。分配系数对抑制剂的 K_I 之影响为

$$K'_I = K_I/\rho \qquad (11.8\text{-}6)$$

荷电的抑制剂对酶反应的抑制影响也因载体带相同电荷而减轻，或带相反电荷时会增强。分配效应影响 pH 的关系式为

$$a_{H_i^+} = a_{H_o^+}\exp\left(-\frac{e\varphi}{k_BT}\right)$$

$$\Delta pH = pH_i - pH_o = \frac{0.43e\varphi}{k_BT} \qquad (11.8\text{-}7)$$

归纳一些规律可定性描述：载体与底物（或产物或其它效应物）带相同电荷时，反应系统的 K_M 将由于固定化而增大，若带相反电荷，则 K_M 将减小；酶固定化于带正离子载体时，其最适 pH 会向酸性方向偏移，而带阴离子载体将导致酶的最适 pH 向碱性方向偏移；分配效应可通过提高介质的离子强度以压缩固体表面 Nernst 层和扩散层而减弱甚至消除；当酶固定化于疏水性载体上，对于极性的或荷电的底物，其 K_M 会升高，如底物也是疏水性物质，则 K_M 将降低。

(4)扩散限制效应

酶固定化后，底物及其它效应物穿过液膜层，进入酶活性中心所在位点（或产物离开固定酶活性中心所在位点到液膜外）的迁移和运

送速度会受到限制，其产生的一种效应称为扩散限制效应。它包括外扩散限制和内扩散限制效应。前者是指底物与其它效应物从宏观体系穿过包围在固定化酶颗粒周围的几乎停滞的液膜层(常称Nernst 层)到颗粒表面(或产物的相反迁移过程)所受到的限制；后者是指底物与其它效应物从颗粒表面到颗粒内部酶活性中心所在位点(或产物相反迁移过程)所受到的限制。外扩散限制效应往往可用充分搅拌而减轻甚至接近消除。内扩散限制效应是受载体的性质和结构所影响。

(二)酶固定化对稳定性的影响

酶在固定化之后，大多数都有较高的稳定性和较长的有效寿命。由于固定化酶的热稳定有所提高，它的酶作用"最适温度"也往往上升，不过酶催化反应的活化能改变较少。

11.8.3 固定化酶基础动力学

当酶和底物存在于载体(如凝胶等)中，由于它们的构象均发生变化，速度常数也可能随之而改变，米氏常数必将不同于在自由溶液环境中所进行的反应，这可分别以 k'_2 和 k'_M 表示，则 Michaelis-Menten 方程变为

$$v = k'_2[E]_o[C_S]/K'_M + [C_S] \qquad (11.8\text{-}8)$$

假如酶催化反应速度受到扩散限制的某种程度影响，其结果必然以 $K_{M,app}$表观米氏常数来表示米氏常数，此时 $K_{M,app} > K'_M$。Sundaran 等提出可近似处理方程，即

$$v = k'_2[E]_S[C_S]/K_{M,app} + [C_S] \qquad (11.8\text{-}9)$$

$$K_{M,app} = K'_M/\rho F \qquad (11.8\text{-}10)$$

式中 $[E]_S$——代表载体内包埋酶的浓度；

ρ——代表分配系数(载体表面的底物与溶液底物浓度之比)；

F——代表 Thiele 函数，它等于 tanh rl/rl，l 为圆盘膜厚

度，$r=\frac{1}{2}(k'_2[E]_S/DK_M)^{1/2}$，D 为载体内底物扩散系数。

当 rl 很小时，F 接近 1，K'_M 仅受分配系数修饰。

包埋酶的载体浸于底物溶液中，存在于外部溶液中的底物必须扩散入载体内方能与酶分子接触。若固定化酶被载体包埋呈圆柱状，底物可从圆柱体两边圆盘膜流入载体，于是扩散速度是一重要影响因素，然而底物在溶液与载体间的分配效应又是另一个影响因素。如底物分子含疏水的非极性基团，载体也带有疏水基团，底物的分配系数 ρ 将大于 1，即底物在载体内比外水溶液中的浓度会更大，这就能产生增加反应速度的效应。

当$[E]_s$很小则催化作用的反应速度足够慢时，扩散速度不影响酶反应速度，化学过程是反应速度的限制因素。

上述各种关系适用于固定在圆柱状载体的酶。其它形状的颗粒就需稍加改变，请看有关专著。

酶固定化后，其反应动力学常数 k'_2 和 K'_M 以及酶催化反应速度随温度改变而变化的情况，可由 Arrhenius 提出的温度与反应速度常数关系式描述。此外，pH 值即氢离子在溶液和固定化酶之间的分配效应也对反应速度有重要影响。在此不再赘述。

11.8.4 酶的化学修饰

(一)酶化学修饰的原理

由于酶本身存在一些性质上缺点，使酶在应用上仍有局限性，其主要表现如下：

(1)酶作用条件的限制与稳定性

一般酶催化反应是在与室温相差不大的基本接近中性的水溶液中进行的，但在工业生产应用中，往往由于产物或底物的影响，使 pH 偏离中性范围，影响了酶活性的稳定性。在生产过程中温度升高，虽然酶促反应速度加快，但往往也引起酶不稳定，如温度太低，便会影响反应速度，因此，天然酶的反应条件常不适用工业生产的要求。

(2)酶具有不稳定性

生物活性大分子酶离开了生物细胞特定的自然环境，在发酵、分离提纯、酶促反应、制剂或固定化酶等过程中，常常显出酶的不够稳定性，无法适应大量生产条件的需要。

(3)天然酶制剂不能满足临床要求

现在使用中绝大多数酶制剂都是从动、植物及微生物中提取的，对人体而言是外源蛋白质，具有抗原性，可能会引起人体的过敏反应，轻则失去酶活力，重则导致生命危险。没有过敏反应的酶剂进入了人体之后很难迅速集中到要治疗的病灶处。

以上种种原因，人类就希望通过人工修饰来改造酶。根据国内外所开展的工作，主要有两个方面研究领域：核酸水平的基因重组技术对 DNA 或 mRNA 进行改造或修饰，以获得一级结构和空间结构更合理的酶蛋白；蛋白质水平上使用化学法或酶法直接对酶蛋白的一级结构进行改造，例如置换其中氨基酸、切断肽链或切除部分肽段来改变空间构象，从而使酶更趋稳定，或对酶分子中氨基酸残基进行化学修饰以降低酶的抗原性。

根据热力学观点，酶的多肽链以一定方式互相折叠形成天然的高级结构构象，它的稳定性与酶分子中许多基团间相互作用的焓和酶分子无序程度的熵有关，即酶高度有序的特定天然构象使它呈现出催化功能、构象的高度有序使熵值小，这是酶不稳定因素，然而酶分子结构内部基团间的相互作用或交联，还有基团与外部水溶液间的相互作用，能产生焓值与熵值给予补偿，使整个酶分子结构的熵处于一平衡状态值(或者是亚平衡状态值)，于是高度有序的构象能够保持。酶热失活的原因是复杂的，人们认为主要的是酶分子内基团的相互作用受热削弱，甚至原先保持平衡的力被破坏，酶分子天然构象就按热力学熵增规律朝熵值高的方向变化，随机松散，折叠结构伸展，导致酶催化功能的丧失。酶的活性部位和维持活性部位稳定性有关基团的任何变化都会影响到酶的催化功能。针对上述问题，酶化学修饰需让酶与修饰剂交联，减少酶分子的伸展和酶分子内部基

团热运动的可能性，从而增加酶的热稳定性。

若酶的化学修饰是共价交联大分子修饰剂便能产生空间障碍或静电斥力而有效地阻挡抑制剂和酶活性部位的接受，使酶的抗抑制剂能力增强。同时也能掩护酶分子上敏感部位免遭蛋白水解酶进行分解破坏的可能性。酶分子结构上含有蛋白水解酶的切点需要保护外，酶的肽链上还有一些氨基酸残基组成的抗原簇，当酶以异源蛋白进入机体后就会诱发抗体的产生，抗原-抗体反应不仅能使酶失活，还会危及人体。酶的化学修饰，使修饰剂与有些组成抗原决定簇的基团形成共价结合，而破坏酶分子上抗原决定簇的结构；或者使大分子修饰剂遮盖抗原决定簇，阻碍抗原与抗体产生结合反应，从而降低或消除酶的抗原性。

由于酶的长链在空间排布形成的高级结构表面，各原子间极性和电荷的不同，各氨基酸残基间相互作用等因素形成了酶活性部位的微环境，微环境的改变会直接影响到酶活性部位氨基酸残基的电离状态，从而影响酶催化功能，例如鸡乳酸脱氢酶在 pH＝4 时便会失活。所以为了维护微环境的相对稳定也是化学修饰的研究课题。

（二）酶化学修饰法

酶化学修饰法的基本原则都是利用修饰剂所具有的各类化学活化基团特性，与酶分子上非酶活化所必需的某些氨基酸残基发生相互作用，对酶分子结构进行改造。目前有如下几种修饰方法：

（1）右旋糖酐及其硫酸酯（Dextran and Dextran Sulphate）的溴化氰法或高碘酸氧化法：右旋糖酐由 α-葡萄糖以 α-1，6 糖苷键形成的高分子多糖，它的邻双羟基在温度低于 4℃ 和激烈搅拌时将溴化氰分次加入的作用下进行活化，然后在碱性条件下与酶分子上氨基反应而共价结合。如果用高碘酸氧化葡萄糖上邻双羟基结构而开环，使右旋糖酐产生高活性醛基与酶分子上氨基反应而共价结合。

（2）糖肽的异氰酸法或戊二醛法：采用 2，3-异氰酸甲苯在低温（4℃，pH＝7.5）条件下对糖肽上氨基活化，再在碱性（pH＝9.5）条件下与酶交联；或使用双功能基团试剂戊二醛将糖肽的氨基活化，然后

与酶分子上氨基反应，联接修饰酶。

(3)采用葡聚糖凝胶(Sephadex G-25)或聚乳糖(Polylactose)作修饰剂：将葡聚糖长链以交联剂联结，形成多孔网状在溶涨状态下的葡聚糖凝胶 G-25，在 pH=4 条件下加入高碘酸使葡萄糖氧化开环，便能与酶反应发生共价结合。不同活化程度的 Sephadex G-25 在生物体内溶解速度不同，可使酶逐渐释放出来；或者用聚乳糖作修饰剂，在 25℃～37℃ 温度和 pH=5～7.5 条件下，采取适当的还原剂(如 BH_3CN)与酶分子上的氨基反应，可得表面乳糖化的修饰酶。

(4)聚乙二醇(PEG)修饰酶：这是以三氯均嗪法、叠氮法或二溴代琥珀酸酐法活化聚乙二醇末端羟基，与酶分子上氨基反应而形成修饰酶；或者用重氮法(如对硝基苄基化合物、N-羧氨基苯甲酐或 4-氟-2-硝基重氮化合物等)将修饰剂 PEG 上有关基团转变为重氮基团，然后在碱性条件下与酶分子上酚基、咪唑基等反应，生成修饰酶；或采用羰二亚胺法，先将 PEG 末端羟基通过无水三乙胺和对-磺酰氯甲苯反应生成中间产物，再经叠氮钠反应后通 H_2 还原，转化为氨基，然后通过羰二亚胺与酶上羧基反应，发生共价交联。

聚乙二醇作修饰剂具有较好的生物相容性，聚乙二醇在体内不残留，无毒性和无抗原性。

(5)大分子修饰剂：用于酶化学修饰的大分子主要是乙烯吡咯烷酮、乙烯醇、丁烯酸、丙烯酸、乙烯乙酸，丁烯二酸等自聚或共聚的多聚物，还有生物活性大分子肝素、血清白蛋白等。例如，聚乙烯醇先与对-硝基苯氧酰氯、再与连二亚硫酸钠相继反应而活化，然后通过羰二亚胺与酶上羧基共价结合；聚丙烯酸经羰二亚胺反应活化后，也能与酶上氨基共价结合，生成了修饰酶。

目前，在修饰酶领域的研究已非常广泛，但酶化学修饰毕竟是一门新技术，只能说仅作了些初步探讨，基本上尚未掌握其中的原理。

11.8.5 酶的应用

酶在工农业生产上的应用很广，现归纳列举如下：

(一)青霉素酰化酶在半合成青霉素方面的应用与研究

青霉素酰化酶以作用底物的不同分为三类，它们是青霉素G酰化酶，主要存在于细菌中，适用于裂解青霉素G成为6-氨基青霉烷酸(6-APA)；青霉素V酰化酶，主要存在于霉菌、放线菌与酵母菌中，适用于裂解青霉素V为6-APA；氨苄青霉素酰化酶，存在于黑色假单胞杆菌和卵形假单胞杆菌中，适用于裂解氨苄青霉素成为6-APA，6-APA是半合成青霉素的母核，在6-APA的氨基上接上某些侧链，可获得高效、广谱、服用方便的半合成青霉素，如氨苄青霉素，甲氧苯青霉素，羟氨苄青霉素和羧苄青霉素等，这是酶在医药生产实践中一个突出的重要例子。

在工业上生产6-APA，一般采用大肠杆菌的青霉素G酰化酶与巨大芽孢杆菌的青霉素G酰化酶，前者为胞内酶，后者是胞外酶，可通过吸附法精制。除此之外，也采用镰刀霉菌的青霉素V酰化酶。用固定化酶法制备6-APA具有工艺简单，收率高，反应条件温和，三废少等优点。1980年全世界共用了15～30吨固定化青霉素酰化酶，生产了3000吨6-APA。然而，对酶法裂解制备6-APA的研究仍在进一步进行。同时积极地开展了酶法缩合制备半合成青霉素等的研究。

(二)酶制剂在医药上的应用

酶在医疗上的应用很广，列举一些酶制剂如下：

(1)消化酶主要帮助人们加强消化，从而可摄取多种营养。它是由蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶、纤维素酶等水解酶按合理的配比组合成的胶囊或包衣片。

(2)消炎酶在临床上常用的有胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、菠萝蛋白酶等治疗炎症、浮肿等疾患，并能分解坏死组织。此外，链激酶和尿激酶可用于解除凝血块，治疗血栓静脉炎等。尿酸酶可用于分解尿酸，治疗由于尿酸过多而引起的关节炎和痛风。作为消炎酶使用的尚有核酸酶、溶菌酶等。

(三)用于食品加工的酶

酶在食品加工中更是得到广泛的应用。例如，淀粉加工成各种

制品所用的酶有：α-淀粉酶和β-淀粉酶（水解终产物是麦芽糖、糊精等），糖化酶（产物葡萄糖，该酶主要是用玉米浆、豆粉作培养基，培养良种黑曲霉中提取的），葡萄糖异构酶（产物果糖）等。酶水解淀粉生产葡萄糖已成为酶催化的一大工业。应用葡萄糖异构酶生产果糖也是酶工程在食品生产中成功的产业。

在乳品工业上最重要的应用酶是制造干酪的凝乳酶和分解乳糖的乳糖酶。

在水果加工中酶也有很广泛的用处，由黑曲霉生产的柚苷酶或球形节杆菌生产的柠碱酶可用于桔汁脱苦处理。还有黑曲霉在底物诱导下产生的橙皮苷酶可消除桔子罐头汁的白色混浊等等。

酿酒工业中更是各种酶类争芳之处，主要有淀粉酶、蛋白酶、β-葡聚糖酶、纤维素酶以及核酸分解酶等，它们分别分解原料（麦芽、大麦、大米、玉米等）中淀粉蛋白质，生成还原糖、糊精、各种氨基酸、肽类等物质。按不同配比酿造出各种品味的酒。

（四）酶在轻化工业中的应用

例如，在纺织工业中利用淀粉酶上浆褪浆；缩短了工艺时间，实现节能低耗提高产品质量的新工艺；在制革工业中利用蛋白酶，既能加速皮革浸水、软化、脱毛等过程，又可变革脏、臭、累的旧工艺。还有在洗涤剂中加酶，便能赋予去污力强、缩短洗涤时间，延长纺织品寿命等优点。

酶制剂尚可能在保护环境处理三废中发挥作用，已开展了固定化酶或固定化微生物处理法的研究。例如，利用茄病镰刀霉中分离得到的分解氰化物酶，处理含氰废水已见初效。

（五）酶电极

固定化酶用于化学分析的典型例子有酶电极，它主要由电化学传感器和固定化酶两部分组成，酶在检测低浓度的某特殊成分（作为底物）中将其转化为产物。例如，测定尿素是用固定化脲酶凝胶附在玻璃电极泡端，当固定化酶将尿素分解成 NH_4^+ 时可测得尿素的含量。许多氨基酸、醛类、葡萄糖、青霉素、肌酸、乙醇均可使用各种酶

电极来测定它们在溶液中的浓度(参见表 11-12)。

表 11-12 一些酶电极的举例

酶	被测组分	固定化方法和载体	检测方法	测定范围	响应时间	干扰物质	稳定性
脲酶	尿素	包埋在聚丙烯酰胺凝胶中	电位测定 NH_4^+	10^{-4} M ~ 10^{-2} M	1~3min	K^+	一星期
葡萄糖氧化酶	葡萄糖	包埋在赛璐玢薄膜中	铂电极电流测定 H_2O_2	5×10^{-4} M ~ 2×10^{-2}M	静态 1min 动态 12s	Ag^+, Hg^{2+}, Cu^{2+}, 2-脱氧-D-葡萄糖	
		包埋在聚丙烯酰胺凝胶中	玻璃电极电位测定 pH	10^{-3} M ~ 10^{-1} M	2min		2~3 星期
L-氨基酸氧化酶	L-氨基酸	酶与白蛋白+戊二醛+尼龙膜共价交联	铂电极电流测定溶解 O_2	对于苯丙氨酸 6×10^{-5} ~ 8×10^{-4}M	4~5min		4 个月
L-赖氨酸脱羧酶	赖氨酸	在探头的聚四氟乙烯膜上用白蛋白+戊二醛一起交联	气体电极电位测定 CO_2	5×10^{-5} M ~ 10^{-1}M	5 ~ 10min		50 天
青霉素酶	青霉素	包埋在聚丙烯酰胺凝胶中	玻璃电极电位测定 pH	10^{-3} M ~ 10^{-1} M	2min		2~3 星期

续表

酶	被测组分	固定化方法和载体	检测方法	测定范围	响应时间	干扰物质	稳定性
胆固醇氧化酶	胆固醇	在胶原膜上共价固定	电流测定 H_2O_2	10^{-7} M ~ 0.8×10^{-4}M	静态 3~5min 动态 45~60s	3β-甾醇	20℃ 保持几个月
酪氨酸酶	酚类物质	包埋在聚丙烯酰胺凝胶中	铂电极电位测定铁氰化物	苯酚 3.8×10^{-7}M ~ 10^{-4}M	6min	p-甲酚苯胺苯甲酸	
淀粉葡萄糖苷酶+葡萄糖氧化酶	麦芽糖	在胶原膜上共价固定	电流测定 H_2O_2	3×10^{-7} M ~ 5×10^{-4}M	静态 6~7min 动态 1~1.5min		20℃ 几个月

M 代表摩尔浓度

除了上述的例子之外，还有酶在化妆品中的应用、在分析中的应用、在体外循环抗血栓的生物医学工程中的应用、以及能源开发上的应用等等，总之，应用领域之广，无法逐个叙述。

11.9 基因工程与基因重组技术

11.9.1 基因工程与基因重组技术的开发依据和方法

70 年代以来，在分子生物学、微生物遗传学的研究基础上，首先在微生物遗传基因的“改造”取得了突破性进展。发展了基因工程，开拓基因重组技术。根据分子生物学的研究揭露，生物体的遗传物质是脱氧核糖核酸(DNA)，它是以数以千计或万计以上的核苷酸按一定顺序排列组成多聚核苷酸长链，而形成双链螺旋的空间结构。

生物体的遗传特征是以密码的形式编码在DNA分子上,并具体呈现在特定的核苷酸排列顺序中。它通过自身复制,将遗传信息从亲代传递给子代。在后代的个体发育过程中,遗传信息自DNA转录给RNA(核糖核酸),又通过RNA按mRNA上三联体密码转译成特异的蛋白质,从而在实现各种生命活动中,后代表现出与亲代相似的遗传性状。于是按照上述规律开发出基因工程和基因重组技术。

基因工程和基因重组技术往往是通过微生物来实现的。一般使用的是大肠杆菌(E. Coli),方法大致上是:先用限制性内切核酸酶将某种目标基因自细胞染色体中剪切下来,再由核酸连结酶把目标基因“嫁接”到载体(质粒或噬菌体)的DNA上,获得基因重组的DNA,然后,再将这含有目标基因重组的DNA分子,导入寄主细胞(如大肠杆菌)内,让目标基因能在寄主细胞内表达和不断增殖。

将所需要的目标基因分离出来的方法有多种:mRNA反向转录法和基因人工合成法的研究在近年来快速发展,因为它使真核基因在原核生物中表达的可行性较大;物理法、单链化酶切法和亲和保护酶切法等仅在特殊情况下使用;还有mRNA亲和分离法,它是利用亲和层析技术,也可利用mRNA在甲酰胺存在条件下能与相应的DNA片段形成三元络合物的特性,用离心程序达到分离目的。

目标基因在受体细胞中表达和增殖,一般采用异源基因直接进行转化的效率很低,所以均需要载体的协助。现在已发现可用的载体有质粒和噬菌体两大类。常用于大肠杆菌的质粒是pBR322及pKN410等,常用于枯草杆菌的有pUB110等;噬菌体有charon、ρ11、ϕ105等。

基因工程中所用到的酶最基本的是Ⅱ型限制性内切核酸酶,它能识别4~6个核苷酸组成的顺序,在此处高度专一性地将DNA水解成带有粘性末端或平头末端的片段,对目标基因的分离,重组子的形成起着十分重要的作用;脱氧核苷酸末端转移酶,它需要Co^{2+}存在时催化脱氧核苷酸连接于DNA 3′—OH末端,在构建重组子时用以形成粘性末端;DNA连接酶,它能催化DNA的3′—OH端与5′—

磷酸形成磷酸二酯键而起连接作用，其中常用的有 T_4DNA 连接酶，这类酶常统称为基因重组技术中的工具酶。如果目标基因要通过反向转录获得，则还需要反向转录酶、DNA 聚合酶和核酸酶 S_1 或核酸酶 Bal31 等。

11.9.2 基因重组和表达

以目标基因片段和载体 DNA 连接构建重组子的操作示意于图 11-16，这是通常所用的直接粘接法技术，操作较简单，但无效重组率高，它是利用限制性内切核酸酶切出含粘性末端的目标基因片段和将载体质粒切开成为含粘性末端的 DNA，然后应用 DNA 连接酶催化两者粘性末端以互补原则进行衔接。此外，还有平头连接法，粘接法中尚有加尾粘接法，该法是利用末端核苷酸转移酶催化切开的载体质粒 DNA3′—OH 末端，人工添加尾粘接端，然后由 DNA 连接酶催化与目标基因片段连接构建重组子，此法无效重组率较低，但操作繁。

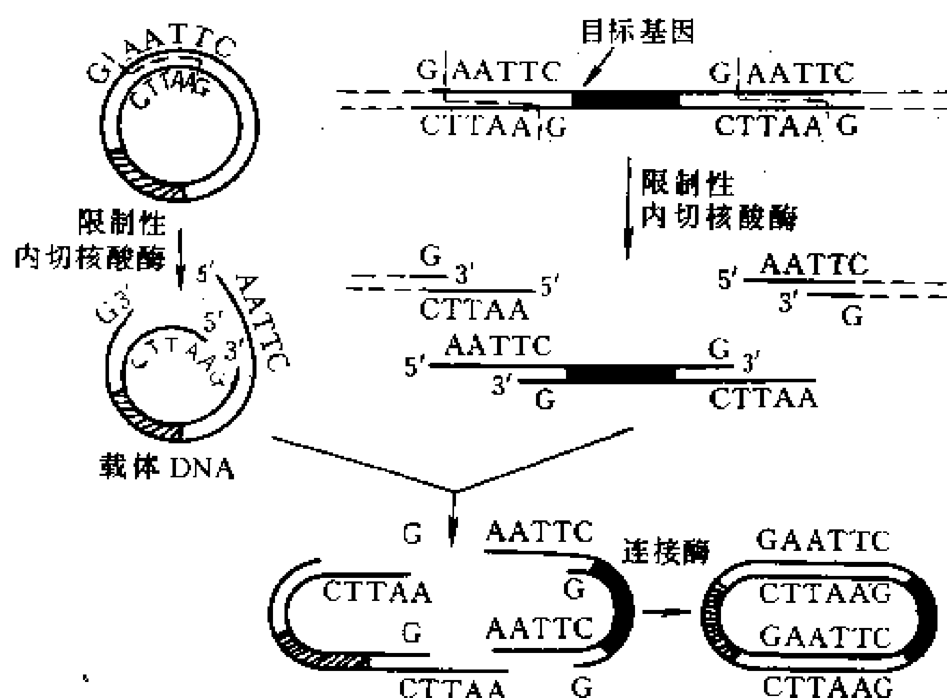


图 11-16　DNA 体外重组方式直接粘接法

为了提高直接粘接法的有效重组率，改进方向是采用识别核苷酸顺序专一性上，具有部分共同要求的两种限制性内切核酸酶，例

如,BglⅡ能识别GGA TCC顺序,BamHI能识别AGA TCT顺序,应用两者分别处理目标基因DNA和载体DNA,然后在这两种酶同时存在情况下,用连接酶连接。

目标基因重组所构建的DNA重组分子需要导入到异源DNA易引入并能接受的寄主细胞(如大肠杆菌等)内,经转化后通常置于含标记抗菌素的丰富培养基中进行增殖,筛选。这种通过DNA重组技术使特定基因片段在受体细胞内大量增殖、拷贝数量大增所形成的无性繁殖系常称作克隆(cloning)。基因工程的完成往往还需在重组子增殖的基础上进行表达,即使特定基因进一步转录、翻译为相应的蛋白质(如酶),进而获得它们的代谢产物。

例如,从人胰脏细胞内获得DNA片段,经一系列基因工程的技术操作,得到所需的目标基因DNA片段(或者用其它如化学合成法,获得该基因),将此目标基因的DNA片段重组到载体(如质粒)内,然后再把重组质粒(重组子)导入细菌(如大肠杆菌)内,得到能生产人胰岛素的所谓"工程菌",进而用发酵法生产人胰岛素。这种用基因工程手段,通过大肠杆菌表达,生产人胰岛素的技术,已于1980年首先在美国获得成功,并将产品"Humulin"投入市场。目前用基因工程已经或即将进行商品化生产的有干扰素、人生长激素、牛生长激素以及某些疫苗等产品。

结　束　语

综合以上的介绍,生物技术是将生物、物理、化学等自然科学的原理,应用于工农业生产的某一具体方面,研究该生产领域中规律和开发新技术的学科。因此,生物技术工作者需要尽可能多地掌握微生物学、细胞学、生物的生理生化特性知识,酶技术以及物理化学原理和手段,以便更多的自由度去遨游这广阔的高新科技领域,为人类医治疾病、开拓工农业生产的新科技生产力作出贡献。

参考文献

[1]R.A.Alberty and F.Daniels 著,Physical Chemistry.5th Ed.Wiley,New York,1975

[2]D.E.Atkinson 著,Cellular Energy Metablism and its Regulation,Acad.Press,1977

[3]L.L.Ingraham and A.B.Pardee 著,Free Energy and Entropyin Metabolism,In D.M.Greenberg(Ed.),Metabolic Pathways.Vol.1.New York.Academic Press,1967

[4]C.R.Cantor and P.R.Schimmel 著,Biophysical Chemistry,San Francisco,Freemen,1980

[5]D.Freifelder 著,Physical Biochemistry,Applications to Biochemistry and Molecular Biology,Freeman,1982

[6]普赖斯·德韦克著,陈竹生,陈竹铭译,生物化学中的物理化学原理和问题,北京科学出版社,1985

[7]G.Zubay 主编,曹凯鸣等译,生物化学,上册,上海复旦大学出版社,1989

[8]G.Zubay 主编,曹凯鸣等译,生物化学,下册,上海复旦大学出版社,1989

[9]沈同等编著,生物化学,上册,2 版,北京高等教育出版社,1990

[10]沈同等编著,生物化学,下册,2 版,北京高等教育出版社,1991

[11]周润琦,陈石根,李致勋编著,生物化学基础,北京化学工业出版,1992

[12]聂剑初等编,生物化学简明教程,北京人民教育出版社,1981

[13]K.E.Van Holde 著,郁贤章译,物理生物化学,北京科学出版社,1978

[14]J.Gareth Morris 著,王嶽等译,生物学工作者的物理化学,北京科学出版社,1981

[15]程极济,林克椿共同主编,生物物理学,北京人民教育出版社,1981

[16]E.A.Stroev 著,Biochemistry,Mir Pub,Moscow,1989

[17]L.Stryer 著,Biochemistry,3rd;Computer Science Pr.,New York,1988

[18]I.H.Segel 著,吴经才,张光兴,静天玉等译,生物化学计算,北京科学出版社,1983

[19]游效曾编著,结构分析导论,北京科学出版社,1980

[20]Paul C.Hiemenz 著,Principles of Colloid and Surface Chemistry,Marcel Dekker Inc.,New York and Basel,1977

[21]G. C. Barrett 著,Chemistry and Biochemistry of Amino Acids,Chapman & Hall,1985

[22]T. G. Cooper 著,The Tools of Biochemistry Wiley,1977

[23]E. Heftman 著,Chromatography,A laboratory Handbook of Chromatographic and Electrphoretic Methods,3rd ed. Van Nostrand 1975

[24]F. E Regnier,K. M. Gooding,High Performance Liquid Chromatography of Proteins,Anal. Biochem. 103. 1. 1980

[25]M. F. Perutz,Hegulation of Oxygen Hemoglobin:Influence of Structure of The Globin on The Hemeiron,Ann. Rev. Biochem. ,48,327,1979

[26]B. W. Metthews 著,X-ray Structure of Proteins,In:Neurath H. ,Hill RL (eds.):The Protein(3rd ed.)Vol. 3 P404,Acad. Press,1977

[27]M. Dixon and E. C. Webb 著,Enzymes,3rd ed. London,Longmans,1979

[28]R. L. Cross,The Mechanism and Regulation of ATP Synthesis by F_1-ATPases, Ann. Rev. Biochem. ,50,681,1981

[29]R. K. Clayton 著,Photosynthesis:Physical Mechanisms and Chemical Patterns, Cambridge,Cambridge University Press,1980

[30]P. Mitchell,Keilin's Respiratory Chain Concept and its Chemiosmotic consequences,Science,206,1148,1979

[31]W. Stoeckenius,The Purple Membrane of Salt-loving Bacteria,Sci. Am. ,234 (6),38,1976

[32]S. Fleischer and L. Packer(Eds),Methods in Enzymology Vol. 31 and 32,New York,Academic Press,1974

[33]E. Racker 著,A New Look at Mechanisms in Bioenergetics,New York,Academic Press,1976

[34]M. K. Jain and R. C. Wagner 著,Introduction to biological Membranes,New York,Wiley,1980

[35]F. Bronner and A. Kleinzeller(Eds),Current Topics in Membranes and Transport,New York,Academic Press

[36]B. P. Rosen(Ed.),Baclerial Transport,New York,Alan Liss,1977

[37]H. K. Schachman 著,Ultracentrifugation in Biochemistry,New York,Academic Press Inc. ,1959

[38]L. Stryer,Implication of X-Rey Crystallographic Studies of Protein Structure,

Ann. Rev. Biochem. ,37,25(1968)

[39] J. P. Greenstein, M. Winite 著, Chemistry of The Amino Acid 3vols, Wiley, 1961

[40] J. C. Touchstone 著, Practice of Thin Layer Chromatography, Wiley-Interscience, 1978

[41] J. N. Davidson 著, The Biochemistry of The Nucleicacid, Acak. Press, 1977

[42] D. Freifelder 著, The DNA Molecule Structure and Propeities, Freeman WH and Company, San Francisco, 1978

[43] N. C. Price, L. Sterens 著, Fundamentals of Enzymology, Oxford Univ. Press, 1982

[44] D. G. Nicholls 著, Bioenergetics: An Introduction to The Chemiosmotic Theory, Academic Press, 1982

[45] W. B. Wood 著, The Molecular Basis of Metabolisom, McGraw-Hill, 1974

[46] R. C. Blankenship and W. W. Parson, The Photochemical Electron Transfer Reaction of Photosyn the tic Bacteria and Plant, Ann. Rev. Biochem., 47, 635, 1978

[47] Y. Hatefi, The mitochondrial Electron Transport and Oxidative Phosphorylation System, Annu. Rev. Biochem. ,54, 1015, 1985

[48] D. A. Bender 著, Amino Acid Metabolism, Wiley, 1975

[49] T. Hunt 著, DNA Mades RNA Makes Protein, Elsevier, 1983

[50] A. Kornberg 著, DNA Replication, Freeman, 1980

[51] H. M. Temin, RNA-directed DNA Synthesis, Sci. Amer. ,226(1):24, 1972

[52] R. Haselkkom, L. B. Rothman-Denes, Protein Synthsis, Annu. Rev. Biochem., 43,397, 1973

[53] G. D. Leonard et al 著, Basic Methods in Molecular Biology, Eisovier, 1986

[54] K. M. Ulmer, Protein Engineering, Science, 209, 666, 1982

[55] S. Aiba, A. E. Humphrey and N. Millis 著, "Biochemical Engneering, 2nd ed., University of Tokyo Press, 1973

[56] J. E. Bailey and D. F. Ollis, Biochenical Engineering Fundomentals 3nd ed., McGraw-Hill Book Company, 1986

[57]俞俊棠,顾其丰,叶勤编著,生物化学工程,北京化学工业出版社,1991

[58]合叶修一,永井史郎著,胡章助等译,生物化学工程:反应动力学,北京化学

工业出版社,1984
[59]焦瑞身等编著,生物工程概论,北京工业出版社,1991
[60]熊振平等编著,酶工程,北京化学工业出版社,1989
[61]田口久治,永井史郎编,微生物培养工学,共立出版社,1985
[62]E. L. Gaden, Fermentation Process Kinetics, J. Biochem. Mierobiol Tech. Eng., 1,413~429,1959
[63]S. B. Lee, A. Seressiotis and J. E. Bailey, A Kinetic Model for Product Formation in Unstable Recombinant Populations, Biotech, Bioeng., 27, 1699~1709, 1985
[64]D. F. Ollis and H. T. Chang, Batch Fermentation Kinetics with (Unstable)Recombinant Culture, Biotech. Bioeng., 24, 2583~2586, 1982
[65]程慕颐博士编著,细菌学总论,上海同德医学院出版,1949
[66]程慕颐博士编著,细菌学各论,上海同德医学院出版,1949
[67]程传煊,苏英草等,PVA 在碱性水溶液中与初生氢氧化铜的作用,福建师范大学学报(自然科学版),6(3),73~79,1990
[68]程传煊,苏英草,聚乙烯醇高聚物保护疏水性氢氧化铁的机理——多核氢氧化铁-聚乙烯醇包合物的形成,物理化学学报,Vol. 7, No. 3, 1991
[69]G. K. Ackers; Analytical Gel Chromatography of Protein, Adv. Protein Chem., 24, 343, 1970
[70]P. C. Wang, H. Otak and K. Toda, Stablility of Plasmid Bearing Microorganisms in Batch and Continuous Culture, J. Ferm. Tech, 66, 63~67, 1988
[71]S. B. Primrose et al., The Application of Continuous Culture to The Study of Plasmid Stability. in "Continuous Culture" (ed. A. C. R. Dean et al.) Vol. 8. Chapt. 14, Ellis Harwood-Publishers, 1984
[72]程传煊编著,表面物理化学,科学技术文献出版社,北京,1995